ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IV No 1

1 9 5 5

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie opublikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, Al. Racławickie 20.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie oraz angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski, niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie i rosyjskie lub polskie i angielskie (francuskie, niemieckie). Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora(ów), nazwę i adres zakładu w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania; c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne (nie dłuższe niż 15% tekstu).

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam, gdzie to możliwe, powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze istotne wyniki. Rysunki i wykresy należy sporządzać w dwukrotnym powiększeniu, tuszem na bristolu bez połysku — każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz nr rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem nru rysunku i wykresu. W objaśnieniach należy podawać powiększenie. Fotografie powinny być kontrastowe na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia) oraz dołączyć wykaz tablic i rysunków z podaniem numeracji i miejsca w tekście.

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Cienkowski (18..) lub (Cienkowski 18..). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwę czasopisma w przyjętych skrótach, tom, ewentualnie zeszyt, stronicę czasopisma: w wypadku zaś cytowania książki: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i firmę wydawcy, ewentualnie stronicę tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml a nie ccm, g — a nie gr, 100⁰ — a nie 100°C, M-molarny, N-normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżniać „%“ — g na 100 g roztworu, „% objętościowy“ — ml na 100 ml roztworu „stężenie % — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich.

W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują *Acta* bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 28.— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja Acta Mikrobiol. Polon., Lublin, Al. Racławickie 20).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IV No 1

1955
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek tytularny PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwice, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Lublin, Eugeniusz Pijanowski — członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa.

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Kazimierz Dygdała

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE WARSZAWA — 1955

Nakład 1361 (1259+102)	*Oddano do składania 22.XI.54*
Ark. wyd. 6,3 Ark. druk. 4,75	*Podpisano do druku 14.III.55*
Papier bezdrz. III kl. 80 g. 70×100	*Druk. ukończono 18.III.55*
Cena zł 10.—	*Zamówienie 1487c/54 B-6-284*

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

H. Kwarta

WPŁYW RÓŻNYCH METOD WYSUSZANIA NA AKTYWNOŚĆ FAGA

Z Zakładu Mikrobiologii Weterynaryjnej U. M. C. S. w Lublinie
Wpłynęło dn. 26.V.1954 r.

Zastosowanie bakteriofagów w celach profilaktycznych i leczniczych wysunęło jako jeden z ważnych problemów ich przechowywanie przez dłuższy okres czasu w stanie czynnym.

Od dawna zostało uznane, że wygodną formą, ze względu na zmniejszenie objętości materiału i utrzymanie go w stanie jałowym, jest przechowywanie bakteriofagów w postaci wysuszonej.

Pierwszy wykonywał próbę otrzymywania fagów w stanie wysuszonym d'Herelle (1920), napawając zwitki bibuły płynem zawierającym bakteriofaga *Shigella* i wysuszając je. Czynnik lityczny dawał się wykryć w stanie aktywnym jeszcze po sześciu miesiącach.

Watanabe (wg Fejgin, 1924) wysuszał bakteriofagi w temperaturze 70^0 i wykazał, że miano ich przy tym nie spadło.

Kolesow (1949) podaje, że bakteriofag przy 70 — 75^0 traci swoją aktywność. Może ją jednak zachować w obecności gliceryny i węglowodanów, to jest tych substancji, które mają zdolność chronienia białka przed działaniem temperatury. Wysuszony bakteriofag jest bardziej oporny na wyższą temperaturę aniżeli znajdujący się w płynnym środowisku.

Kabeshima (wg Fejgin, 1924) wydobywał czynnik lityczny przez strącanie bakteriolizatu acetonem lub eterem. Do bakteriolizatu dodawał podwójną objętość acetonu, a po 48 godzinach odwirowywał. Otrzymał w ten sposób żółtawo-biały proszek o silnych własnościach litycznych.

Wahl i Blum (1949) oczyszczali i koncentrowali bakteriofagi pałeczek Flexnera. Najpierw oddzielano nieczynne białko bakteryjne od wirusa przez precypitację fosforanem wapnia. Płyn znad osadu poddano dializie i dializat precypitowano etanolem przy −15^0. Natomiast precypitacja metanolem, wtórna precypitacja etanolem, trawienie trypsyną, ultrafiltracja nie dały odpowiednich wyników.

Levaditi i Lepine (1948) zalecają bardzo szybkie wysuszenie, ponieważ przy powolnym dochodzi do proteolizy i do zniszczenia wirusa. Jako środki odwadniające polecają oni używać chlorku wapnia i pięciotlenku fosforu. Autorzy podkreślali, że przy zastosowaniu kwasu siarkowego fagi ulegały inaktywacji.

Ostatnio stosuje się liofilizację wirusów w stanie wysuszonym.

Według Doerra i Hallauera (1950) aktywność wirusa maleje podczas samego procesu liofilizacji, natomiast już po wysuszeniu inaktywacja zwykle dalej nie zachodzi. Temperatura optymalna do przechowywania materiałów wysuszonych wynosi -20^0.

Schade i Caroline (1944) wysuszali poliwalentne bakteriofagi czerwonkowe drogą liofilizacji po uprzednim zagęszczeniu ich w aparacie próżniowym. Ażeby zmniejszyć ilość soli w przesączach, a tym samym ich higroskopijność, dializowano je w wodzie bieżącej przez 17 godzin. Koncentracja i dializa bakteriofagów w temperaturze $22,5^0$ nie wpływały na spadek miana. Skoncentrowany bakteriofag wysuszano w aparacie liofilizacyjnym. Otrzymane w ten sposób wysuszone bakteriofagi okazały się biologicznie aktywne, przy czym aktywność ta utrzymywała się w ciągu sześciu miesięcy. Autorzy wspominają, że podobne wyniki, przy zastosowaniu wyżej wskazanych metod wysuszania, otrzymano przy bakteriofagach gronkowcowych, pałeczki okrężnicy i innych. Tylko fag Shiga okazał się wrażliwy na proces liofilizacji.

Putnam i Kozloff (1949) podają, że bakteriofag T_6 *B. coli* ulega inaktywacji podczas liofilizacji oraz przy podgrzewaniu do 55^0.

BADANIA WŁASNE

Celem pracy było otrzymanie bakteriofagów o wysokim mianie działających na pałeczkę okrężnicy i zbadanie wpływu wysuszania i przechowywania na siłę lityczną bakteriofagów.

W celu podwyższenia miana fagów pasażowano je na szczepach wrażliwych. Miano wirusa określano przy pomocy metody płytkowej wg d'Herelle'a.

WPŁYW SUSZENIA NA BAKTERIOFAGI

Wszystkie fagi użyte do suszenia w ilości 5 zostały wyodrębnione z kału prosiąt.

Fag Nr 22 adaptowano na szczepie Kaufmanna Nr 22. Fag ten po 16 pasażach wykazywał miano $1,4 \times 10^{10}$.

Fag Nr 10, adaptowano na szczepie Kaufmanna Nr 10, po 22 pasażach miał on miano $8,7 \times 10^8$.

Fag Nr 94 adaptowano na szczepie hemolitycznym Nr 94 wyhodowanym ze świni, po 18 pasażach posiadał miano $9,7 \times 10^8$.

Fag Nr 11 adaptowano na szczepie hemolitycznym Nr 11 wyizolowanym ze świni; po 20 pasażach miał miano 3×10^8.

Fag Nr 3 adaptowano na szczepie hemolitycznym Nr 3 wyhodowanym ze świni; po 15 pasażach miano jego wynosiło $6,6 \times 10^8$.

Suszenie bakteriofagów przeprowadzono w aparacie próżniowym, termostacie, chłodni i aparacie liofilizacyjnym.

Do wszystkich doświadczeń używano stale tych samych fagów (Nr 22, Nr 10, Nr 11, Nr 94 i Nr 3). Fagi wysuszone różnymi metodami zeskrobywano z płytek jałowym skalpelem. Uzyskany proszek dzielono na 3 równe części umieszczając go w oddzielnych probówkach. Jedną

część rozpuszczano w bulionie do $^1/_3$ pierwotnej objętości i oznaczano miano bakteriofaga bezpośrednio po wysuszeniu. Z pozostałych 2 części, jedną przechowywano w chłodni w temperaturze 2^0, drugą w temperaturze pokojowej.

Pierwszą serię doświadczeń wykonano przy pomocy aparatu próżniowego połączonego z aspiratorem wodnym. Płaszcz wodny aparatu był podgrzewany do 40^0, a ciśnienie wewnątrz aparatu wynosiło 160 mm słupa rtęci.

Na 5 płytek Petri'ego o średnicy 9 cm wylano po 8 ml płynu zawierającego bakteriofaga i umieszczono je w aparacie próżniowym. Po 28 godzinnym suszeniu otrzymano masę barwy żółto-brązowej.

Drugą serię doświadczeń wykonano susząc bakteriofagi w tymże aparacie próżniowym przy zastosowaniu pompy ssącej olejowej. Płaszcz wodny aparatu próżniowego miał temperaturę pokojową, a ciśnienie wewnątrz wynosiło 40 mm słupa rtęci. Dwa razy dziennie przewietrzano bakteriofagi w aparacie wpuszczając strumień powietrza przez filtr nasycony środkiem odkażającym. Suszenie trwało 4 dni.

W następnym doświadczeniu suszono bakteriofagi używając pompy próżniowej przy ciśnieniu 40 mm słupa rtęci, stosując jako środek chłonący wilgoć $CaCl_2$. Suszenie przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Już po 24 godzinach nastąpiło zupełne wysuszenie płynów z fagami.

Zastosowano także wysuszanie bakteriofagów w otwartych płytkach w cieplarce przy 37^0. Na płytki Petri'ego o średnicy 9 cm wylano po 3 ml zawiesiny faga. Suszenie fagów przeprowadzono jeszcze inną metodą. Zawiesinę faga w ilości po 2 ml rozlano na 5 płytek Petriego o średnicy 4 cm. Płytki umieszczano w wyjałowionym eksykatorze z $CaCl_2$. Szczelnie zamknięty eksykator wstawiano do cieplarki o temperaturze 37^0. Po upływie 24 godzin stwierdzono wysuszenie zawiesiny bakteriofagów.

Doświadczenie to powtórzono umieszczając eksykator z $CaCl_2$ w chłodni o temperaturze 2^0. W tych warunkach suszenie trwało dwie doby.

Jako ostatnią metodę zastosowano liofilizację zawiesiny bakteriofagów *).

WYNIKI BADAŃ

Przy zastosowaniu różnych metod wysuszania bakteriofagów, zaobserwowano niejednakowy spadek miana. Największy spadek własności litycznych nastąpił po suszeniu bakteriofagów w termostacie (Tab. I).

Spadek miana był mniejszy podczas suszenia przy 37^0 w eksykatorze w obecności $CaCl_2$, niż podczas suszenia fagów w cieplarce bez chlorku wapnia, za wyjątkiem szczepu Nr 11, który przy zastosowaniu obu metod uległ całkowitej inaktywacji. Spadek miana fagów nie jest bezpośrednio zależny od pierwotnego ich miana. Szczep Nr 3 oraz szczep Nr 10 przed suszeniem posiadały prawie jednakową siłę liityczną (Nr 10 był 1,32 × silniejszy), natomiast po wysuszeniu w obecności $CaCl_2$ szczep Nr 10 działał 173 razy silniej od szczepu Nr 3. Szczep Nr 11

*) Fagi liofilizowano w PIW. w Puławach, za co serdecznie dziękuję Dyrekcji PIW.

przed suszeniem wykazywał wprawdzie niższe miano od pozostałych 4 fagów, ale różnica była niewielka (2,2 raza słabszy od faga Nr 3; 3,2 raza od faga Nr 94; 2,9 raza od faga Nr 10 oraz 46,7 raza słabszy od faga Nr 22). Szczep ten uległ całkowitemu unieczynnieniu podczas suszenia.

TABELA I

Wpływ wysuszania w termostacie na miano bakteriofagów
Влияние высушивания в термостате на титр бактериофагов.
The influence of the drying on the *B. coli*-bacteriophages titer.
I. The drying at 37° under normal atmospheric pressure.

Nr faga	Miana bakteriofagów		
	przed wysuszeniem	po wysuszeniu w temp. 37°	
		termostat	eksykator z $CaCl_2$
22	$1{,}4 \times 10^{10}$	$1{,}2 \times 10^{6}$	$9{,}7 \times 10^{6}$
10	$8{,}7 \times 10^{8}$	$4{,}1 \times 10^{4}$	$6{,}4 \times 10^{6}$
94	$9{,}7 \times 10^{8}$	$4{,}8 \times 10^{4}$	$1{,}1 \times 10^{6}$
11	$3{,}0 \times 10^{9}$	inaktywacja	inaktywacja
3	$6{,}6 \times 10^{8}$	poj. łysinki	$3{,}7 \times 10^{4}$

Przy suszeniu fagów w aparacie próżniowym zastosowano trzy serie doświadczeń. W pierwszej serii wysuszano przy ciśnieniu 160 mm Hg w temperaturze 40°, w drugiej ciśnienie wynosiło 40 mm Hg w temperaturze pokojowej, natomiast w trzeciej przy tych samych warunkach co w drugiej dodano chlorku wapnia jako substancji chłonącej parę wodną.

Podczas wysuszania w obecności $CaCl_2$ spadek miana był mniejszy niż przy suszeniu bez środka chłonącego wilgoć. Nie stwierdzono różnic w zmniejszeniu siły litycznej przy użyciu 2 pierwszych metod (ciśnienie 160 i 40 mm Hg) za wyjątkiem faga Nr 94, który przy ciśnieniu 40 mm Hg wykazywał prawie całkowitą inaktywację, zaś wysuszony przy 160 mm Hg rozpuszczał bakterie w rozcieńczeniu $3{,}8 \times 10^{3}$.

Szczep Nr 11, który przy wysuszeniu w termostacie uległ inaktywacji, również przy odwodnieniu w aparacie próżniowym został całkowicie unieczynniony, za wyjątkiem serii 3-ciej z $CaCl_2$ gdzie miano jego po wysuszeniu wynosiło $3{,}4 \times 10^{4}$. Również i tutaj stwierdzono, że spadek miana fagów podczas suszenia nie jest bezpośrednio zależny od ich pierwotnego miana (tab. II).

Dosyć dobre wyniki otrzymano przy suszeniu bakteriofagów w eksykatorze zawierającym $CaCl_2$ umieszczonym w chłodni. Nieco słabsze rezultaty uzyskano w eksykatorze z $CaCl_2$ w temperaturze 37°. Spadek miana w stosunku do bakteriofagów niesuszonych przedstawia tab. III.

W tej serii doświadczeń fag Nr 11 okazał się najbardziej wrażliwy na wysuszanie i w dużym stopniu został zinaktywowany.

Ostatnia metoda suszenia drogą liofilizacji dała następujące wyniki: (tab. IV).

TABELA II

Spadek miana fagów podczas wysuszania w aparacie próżniowym
Снижение титра бактериофагов во время высушивания в вакуум-аппарате.
The influence of the drying on the *B. coli*-bacteriophages titer. II. The drying in vacuum at room-temperature.

Nr faga	Miano bakteriofagów			
	przed suszeniem	po suszeniu		
		ciśn. 160 mm Hg temp. 40°	ciśn. 40 mm Hg temp. pokojowa	ciśn. 40 mm Hg $CaCl_2$ temp. pokoj.
22	$1{,}4 \times 10^{10}$	$4{,}7 \times 10^{6}$	$7{,}8 \times 10^{6}$	$4{,}6 \times 10^{7}$
10	$8{,}7 \times 10^{8}$	$4{,}9 \times 10^{5}$	$3{,}1 \times 10^{5}$	$1{,}9 \times 10^{6}$
94	$9{,}7 \times 10^{8}$	$3{,}8 \times 10^{3}$	poj. łysinki	$6{,}4 \times 10^{4}$
11	$3{,}0 \times 10^{8}$	inaktywacja	inaktywacja	$3{,}4 \times 10^{4}$
3	$6{,}6 \times 10^{8}$	$7{,}5 \times 10^{4}$	$2{,}3 \times 10^{5}$	$6{,}9 \times 10^{5}$

TABELA III

Wpływ suszenia przy pomocy $CaCl_2$ na miano fagów
Влияние высушивания посредством $CaCl_2$ на титр фагов.
The influence of the drying on the *B. coli*-bacteriophages titer. III. The drying above $CaCl_2$ at room-temperature.

Nr faga	Miano bakteriofagów		
	przed suszeniem	po suszeniu w eksykatorze	
		temp. 2°	temp. 37°
22	$1{,}4 \times 10^{10}$	$2{,}4 \times 10^{7}$	$9{,}7 \times 10^{6}$
10	$8{,}7 \times 10^{8}$	$7{,}9 \times 10^{6}$	$6{,}4 \times 10^{6}$
94	$9{,}7 \times 10^{8}$	$6{,}1 \times 10^{6}$	$1{,}1 \times 10^{6}$
11	$3{,}0 \times 10^{8}$	poj. łysinki	inaktywacja
3	$6{,}6 \times 10^{8}$	$3{,}6 \times 10^{5}$	$3{,}7 \times 10^{4}$

Zatem podczas procesu liofilizacji wirusy ulegały unieczynnieniu w najmniejszym stopniu.

Wyniki poszczególnych metod suszenia wskazują na to, że niektóre szczepy bakteriofagów wykazują większą wrażliwość na wysuszenie, bez względu na metody suszenia.

Bakteriofag Nr 11 w 4-ch przypadkach uległ całkowitej inaktywacji, w pozostałych wykazywał największy spadek miana. Inne bakteriofagi (Nr 22, Nr 10, Nr 94 i Nr 3) dały wyniki pośrednie.

Następnie przebadano wpływ sposobu przechowywania wysuszonych bakteriofagów (w chłodni w temperaturze 2^0 oraz w temperaturze pokojowej) na ich miano.

Wpływ suszenia w różnych aparatach i przechowywania w temperaturze 2^0 i 18^0 na miano bakteriofagów przedstawia tab. V.

TABELA IV

Spadek miana fagów podczas liofilizacji

Снижение титра бактериофагов во время лиофилизации.

The influence of the drying on the *B. coli*-bacteriophages titer. IV. The freezing-drying procedure.

Nr faga	Miano bakteriofagów	
	przed suszeniem	po suszeniu
22	$1{,}4 \times 10^{10}$	$9{,}7 \times 10^{8}$
10	$8{,}7 \times 10^{8}$	$6{,}8 \times 10^{7}$
94	$9{,}7 \times 10^{8}$	$8{,}5 \times 10^{7}$
11	$3{,}0 \times 10^{8}$	$9{,}6 \times 10^{5}$
3	$6{,}6 \times 10^{8}$	$2{,}8 \times 10^{7}$

Bakteriofagi suszone, przechowywane 10 miesięcy w temperaturze pokojowej i w chłodni wykazywały znaczne różnice w spadku miana.

Na przechowywanie w temperaturze pokojowej oraz w chłodni najbardziej odpornymi okazały się fagi liofilizowane. Zliofilizowane szczepy Nr 11 i Nr 3 przechowywane w temperaturze pokojowej uległy prawie całkowitej inaktywacji. Pozostałe trzy szczepy wykazały dość znaczny spadek miana.

Zjawisko to należy prawdopodobnie przypisać lepszemu odwodnieniu podczas liofilizacji, co stwierdził D o e r r (1950).

Fagi suszone w chłodni w obecności chlorku wapnia i przechowywane w temperaturze pokojowej uległy, poza szczepem Nr 22, całkowitej inaktywacji.

Bardzo wrażliwymi na działanie temperatury pokojowej okazały się także, z wyjątkiem szczepu Nr 10, wirusy wysuszone w cieplarce bez $CaCl_2$ oraz w cieplarce w obecności $CaCl_2$ ponieważ zostały zupełnie zinaktywowane.

Podobne wyniki uzyskano z bakteriofagami wysuszonymi w aparacie próżniowym przy ciśnieniu 40 mm Hg w temperaturze pokojowej i przy ciśnieniu 160 mm Hg w temperaturze 40^0. Stosunkowo wysokie miano zachowały fagi suszone w aparacie próżniowym w temperaturze pokojowej przy 40 mm Hg w obecności $CaCl_2$ gdzie tylko szczepy Nr 11 i Nr 3 zostały unieczynnione.

O wiele mniejszy spadek miana wykazały wirusy przechowywane w chłodni. Prócz szczepu Nr 11, szczep Nr 3 okazał się wrażliwy i jego 4 preparaty uległy całkowitej lub prawie całkowitej inaktywacji.

WNIOSKI

1. Różne metody wysuszania powodowały inaktywację bakteriofagów w niejednolitym stopniu.
2. Bakteriofagi wysuszone drogą liofilizacji uległy w najmniejszym stopniu inaktywacji.

TABELA V

Wpływ suszenia i przechowywania na miano bakteriofagów

Снижение титра высушенных бактериофагов, хранимых в холодильнике и при комнатной температуре.

The effect of the method of drying and of the method of storing on the final titer of *B. coli*-bacteriophages.

Nr faga	Miano fagów przed suszeniem		Aparat próżniowy			Termostat 37°		Chłodnia 2°	Zamrażanie -40°	Miano fagów nie suszonych	
			ciśnienie 160 mm Hg temp. 40°	ciśnienie 40 mm Hg temp. pokojowa	ciśnienie 40 mm Hg $CaCl_2$ temp. pokojowa	na płytkach otwartych	eksykator $CaCl_2$	eksykator $CaCl_2$	aparat liofilizacyjny	Bezpośrednio po zakończeniu pracy (3 mies. od rozp. prod.)	w 10 mies. po zakończeniu pracy (przech. 2°)
22	$1{,}4 \times 10^{10}$	Bezpośrednio po suszeniu	$4{,}7 \times 10^{6}$	$7{,}8 \times 10^{6}$	$4{,}6 \times 10^{7}$	$1{,}2 \times 10^{6}$	$9{,}7 \times 10^{6}$	$2{,}4 \times 10^{7}$	$9{,}7 \times 10^{8}$	$8{,}8 \times 10^{9}$	$1{,}5 \times 10^{9}$
		Po 10 mies. 2°	$2{,}3 \times 10^{5}$	$9{,}6 \times 10^{4}$	$8{,}3 \times 10^{6}$	$7{,}8 \times 10^{4}$	$2{,}0 \times 10^{4}$	$1{,}0 \times 10^{6}$	$5{,}2 \times 10^{8}$		
		Po 10 mies. 18°	$3{,}1 \times 10^{4}$	inaktywacja	$8{,}1 \times 10^{3}$	inaktywacja	inaktywacja	$3{,}6 \times 10^{3}$	$8{,}1 \times 10^{5}$		
10	$8{,}7 \times 10^{8}$	Bezpośrednio po suszeniu	$4{,}9 \times 10^{5}$	$3{,}1 \times 10^{5}$	$1{,}9 \times 10^{6}$	$4{,}1 \times 10^{4}$	$6{,}4 \times 10^{6}$	$7{,}9 \times 10^{6}$	$6{,}8 \times 10^{7}$	$8{,}0 \times 10^{8}$	$4{,}3 \times 10^{8}$
		Po 10 mies. 2°	$3{,}6 \times 10^{4}$	$8{,}1 \times 10^{4}$	$8{,}2 \times 10^{5}$	$4{,}5 \times 10^{3}$	$7{,}0 \times 10^{4}$	$4{,}0 \times 10^{4}$	$6{,}2 \times 10^{7}$		
		Po 10 mies. 18°	$1{,}7 \times 10^{3}$	$5{,}1 \times 10^{3}$	$6{,}1 \times 10^{4}$	poj. łysinki	poj. łysinki	inaktywacja	$1{,}5 \times 10^{5}$		
94	$9{,}7 \times 10^{8}$	Bezpośrednio po suszeniu	$3{,}8 \times 10^{3}$	poj. łysinki	$6{,}4 \times 10^{4}$	$4{,}8 \times 10^{4}$	$1{,}1 \times 10^{6}$	$6{,}1 \times 10^{6}$	$8{,}5 \times 10^{7}$	$9{,}4 \times 10^{8}$	$6{,}3 \times 10^{7}$
		Po 10 mies. 2°	$1{,}2 \times 10^{3}$	poj. łysinki	$5{,}0 \times 10^{3}$	$2{,}0 \times 10^{3}$	$3{,}2 \times 10^{4}$	$9{,}2 \times 10^{3}$	$5{,}2 \times 10^{7}$		
		Po 10 mies. 18°	inaktywacja	inaktywacja	$7{,}8 \times 10^{2}$	inaktywacja	inaktywacja	inaktywacja	$6{,}3 \times 10^{3}$		
11	$3{,}0 \times 10^{8}$	Bezpośrednio po suszeniu	inaktywacja	inaktywacja	$3{,}4 \times 10^{4}$	inaktywacja	inaktywacja	poj. łysinki	$9{,}6 \times 10^{5}$	$2{,}0 \times 10^{8}$	$4{,}2 \times 10^{7}$
		Po 10 mies. 2°	—	—	$9{,}3 \times 10^{2}$	—	—	—	$3{,}5 \times 10^{5}$		
		Po 10 mies. 18°	—	—	inaktywacja	—	—	—	$2{,}4 \times 10$		
3	$6{,}6 \times 10^{8}$	Bezpośrednio po suszeniu	$7{,}5 \times 10^{4}$	$2{,}3 \times 10^{5}$	$6{,}9 \times 10^{5}$	poj. łysinki	$3{,}7 \times 10^{4}$	$3{,}6 \times 10^{5}$	$2{,}8 \times 10^{7}$	$3{,}8 \times 10^{8}$	$1{,}6 \times 10^{7}$
		Po 10 mies. 2°	poj. łysinki	poj. łysinki	$7{,}8 \times 10^{3}$	inaktywacja	poj. łysinki	$2{,}7 \times 10^{3}$	$9{,}6 \times 10^{6}$		
		Po 10 mies. 18°	inaktywacja	inaktywacja	inaktywacja	inaktywacja	inaktywacja	inaktywacja	$3{,}6 \times 10$		

3. Poszczególne szczepy bakteriofagów wykazują różny spadek miana przy użyciu tej samej metody wysuszania.

4. Niektóre szczepy bakteriofagów wykazują większą wrażliwość inne mniejszą na wysuszenie, bez względu na użytą metodę, co należałoby uwzględnić przy produkcji dla celów profilaktycznych i leczniczych fagów w stanie wysuszonym.

5. Bakteriofagi wysuszone i przechowywane w chłodni wykazują niewielki spadek miana.

6. Przy przechowywaniu bakteriofagów suszonych w temperaturze pokojowej miano ich szybko spada.

Г. Кварта

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ВЫСУШИВАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОФАГОВ

Резюме

Автор исследовал влияние разных способов высушивания и хранения бактериофагов на их титр. Для исследования использовано 5 штаммов бактериофагов *E. coli*, выделенных из испражнений свиней. Бактериофаги высушивались в вакуум-аппарате, термостате, холодильнике и лиофилизационном аппарате. Наименьшее снижение титра бактериофагов установлено при применении метода лиофилизации. Бактериофаги высушиваемые при помощи других методов проявляли гораздо большее снижение титра. Автор наблюдал также большее снижение титра у бактериофагов хранимых в холодильнике. Отдельные бактериофаги проявляли неодинаковое снижение титра во время высушивания. Одни из них оказывали меньшую, другие гораздо большую устойчивость против высушивания.

H. Kwarta

THE INFLUENCE OF VARIOUS METHODS OF DRYING AND STORING ON *COLI*-PHAGES

Summary

The influence of various methods of drying and storing on *coli*-phages has been studied. Five bacteriophages tested were isolated from pig faeces. It has been demonstrated that these phages differ distinctly in their sensitivness to the drying procedure. The best results (the smallest decrease of the titer) were observed by storing phages in the ice-room, after drying in the lyophilizing apparatus. It was ascertained that the method of preservation has great effect on the final titer of the phage-preparation (Table IV).

LITERATURA

1. Doerr R. u . Hallauer C., 1950: Handbuch der Virusforschung, Springer-Verlag, Wien.
2. Fejgin B., 1924: O bakteriofagach, *Med. Dośw. Społ.*, **2** : 275.
3. d'Herelle F., 1938: Le phenomene de la guerisson dans les maladies infectieuses. Masson et Cie, Paris.
4. Kolesow W. J., 1949: Bakteriołogiczeskij kontrol i fagoterapija w gnojnoj chirurgii., Akad. Med. Nauk., Moskwa.
5. Levaditi C. e. Lepine P., 1948: Les ultravirus des maladies humaines. t. II, Librarie Maloine, Paris.
6. Putnam F. a. Kozloff M., 1949: Biochemical Studies on Reproduction. I. Purification and Properties of *E. coli bacteriophage* T_6., *J. Biol. Chem.*, **179** : 303.
7. Schade A. a. Caroline L., 1944: The Preparation of a polyvalent dysentery bacteriophages in a dry and stable form., *J. Bact.* **48**:179.
8. Wahl R. e. Blum L., 1949: Emerique-Purification et Concentraction du Bacteriophage. II. Precipitation par l'ethanol et redis-solution des phages essais divers., *Ann. Inst. Pasteur.*, **76** .

E. Kocwowa

DZIAŁANIE PENICYLINY I AUREOMYCYNY NA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE, THERMOBACTERIUM CEREALE* I *ACETOBACTER RANCENS*

Z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego w Krakowie.

Wpłynęło dnia 16.II.1954 r.

Antybiotyki znalazły w ostatnich latach szerokie zastosowanie w lecznictwie. Powodzenie osiągnięte na tym polu skłoniło mikrobiologów przemysłowych do prób zastosowania tych substancji jako środków konserwujących. Celem tych badań jest między innymi skrócenie czasu i obniżenie temperatury sterylizacji oraz, co się z tym wiąże, polepszenie smakowych, zapachowych i odżywczych własności konserw. Używane dotychczas w tym celu środki antyseptyczne mają szereg wad i według niektórych autorów stosowanie ich należy ograniczyć do minimum (D e h u t, 1951). Nie wszystkie jednak antybiotyki odpowiadają wymaganiom przemysłu konserwowego. Winny one wykazywać następujące właściwości: 1) dostatecznie silne działanie przeciwbakteryjne w stosunku do form wegetatywnych drobnoustrojów, które wykiełkowały z zarodników w czasie przechowywania konserw, bądź zdolność do zahamowania kiełkowania zarodników, 2) odporność na temperaturę sterylizacji konserw, 3) niskie koszty produkcji, 4) nietoksyczność dla człowieka, 5) brak niszczącego działania na normalną mikroflorę ludzkiego przewodu pokarmowego, 6) jak najmniejszą zdolność do wytwarzania szczepów opornych na ich działanie.

Praca niniejsza została wykonana w latach 1950—1951 a więc w początkowej fazie rozwoju badań nad stosowaniem substancji antybiotycznych w przemyśle konserwowym. W tym okresie nie znaleziono w dostępnej literaturze danych dotyczących wpływu penicyliny i aureomycyny na przebieg procesów fermentacyjnych. Dlatego też celem pracy było ustalenie działania tych substancji antybiotycznych na określone drobnoustroje fermentacji alkoholowej, mlekowej i octowej i ewentualne wykorzystanie wyników do konserwacji płynnych przetworów owocowych. Do czasu przekazania wyników do publikacji pojawiło się wiele prac, z różnych dziedzin mikrobiologii, dotyczących tego zagadnienia.

Wiele antybiotyków wykazuje silne działanie fungostatyczne lub grzybobójcze.

Należy tu wymienić prace Benedicta (1953) i Bernhauera (1950), badania Briggsa i Hanela (1950), Alkiewicza i Graczykówny (1952), Edsona i współpracowników (1952, Thanosa i współpracowników (1952), Stesselа i współpracowników (1952), Wallena i Skocko (1952), Loefera i współpracowników (1953) oraz Lebena i współpracowników (1952).

Jednocześnie stwierdzono jednak, że antybiotyki niekiedy stymulują proces fermentacji grzybkowej np. cytrynowej (Michalska 1952).

Fungostatyczne działanie wywierają również fitoncydy (przegląd literatury w języku polskim — Szymona 1952, Ber 1950).

Omawiając z kolei wpływ antybiotyków na bakterie, występujące w produktach spożywczych, można przytoczyć wiele przykładów ich wrażliwości na działanie różnych związków tego typu. Obok antybiotyków stosowanych w lecznictwie wymienić tu trzeba aktinochryzynę (antimycynę C) działającą bakteriostatycznie w rozcieńczeniu $1 : 10^8$, mikromonosporynę, rodocidynę i borrelidynę (wg Benedicta 1953). Również fitoncydy hamują wzrost bakterii na przykład niezidentyfikowany czynnik soku *Clematis vitalba* (Winter i Willeke 1951). Antybiotycznie czynne są niektóre wyciągi buforowe i kwaśne z pospolitych gatunków porostów (Bylicka, Jarosz, Nowicka i Kunicki-Goldfinger 1952). Autorzy radzieccy z Tokinem na czele, który zapoczątkował badania nad fitoncydami, dostarczyli wiele danych z zakresu działania tych substancji na różne mikroorganizmy (Tokin, 1948).

Zagadnienie stosowania antybiotyków jako środków utrwalających produkty spożywcze nie znalazło dotychczas pełnego rozwiązania. Z uwagi na ewentualne działanie substancji antybiotycznych na mikroflorę przewodu pokarmowego człowieka, subtylina staje się może najbardziej obiecującym antybiotykiem dla celów konserwacji. Jako prosty polipeptyd może ona ulegać rozkładowi w układzie trawiennym, a jak wykazały dotychczasowe próby najbardziej odpowiada wymaganiom stawianym środkom konserwującym.

O dodatnich rezultatach osiąganych przy stosowaniu subtyliny do konserw warzywnych donosi Morse (1950). Dawka 5 — 20 mg na 1 kg produktu pozwalała na skrócenie czasu i obniżenie temperatury sterylizacji oraz uzyskanie trwałości konserw przez 8 miesięcy. Według tego autora podobne wyniki można osiągnąć również przy stosowaniu aureomycyny, chloromycetyny i lupulonu.

O stosowaniu subtyliny do konserwacji produktów spożywczych donoszą również Tilgner (1951) oraz artykuły redakcyjne „Przem. Rolny i Spożywczy", 1950 i „Gordian", 1951.

Schelhorn (1952) osiągał pozytywne rezultaty przy stosowaniu subtyliny przeciw bakteriom kwasotwórczym (*B. stearothermophilus*) a negatywne przeciw bakteriom gnilnym i *Cl. botulinum*. Gramicydyna, bacitracyna i streptomycyna według tego autora są jeszcze mniej skuteczne niż subtylina.

Robiono także doświadczenia nad wpływem niektórych antybiotyków na drobnoustroje znajdujące się normalnie na mięsie. Okazało się, że penicylina i subtylina wpływały opóźniająco na rozwój bakterii, jednak ich nie niszczyły; streptomycyna działała słabo, natomiast lepsze wyniki osiągano przy kombinacjach penicyliny z subtyliną i streptomycyny z penicyliną (art. redakcyjny Przem. Rolny i Spoż., 1951).

P r o s t (1953) doszedł do wniosku, że w określonych warunkach penicylina i streptomycyna nie dopuszczają do rozwoju zarodników znajdujących się w mięsie.

A d a m s i współpracownicy (1953) stwierdzili, że subtylina uniemożliwia kiełkowanie zarodników *Clostridium* w mięsie sproszkowanym.

T a r r i współpracownicy (1953) przeprowadzili próby utrwalania ryb i mięsa przy pomocy streptomycyny, penicyliny, subtyliny, polimyksyny B, cyrkuliny, neomycyny, bacitracyny, gramicydyny, tyrotrycyny, rimocydyny, terramycyny, chloramfenikolu, aureomycyny i innych. Okazało się, że silnie hamująco na rozwój flory bakteryjnej mięsa działały aureomycyna, terramycyna i chloramfenikol (w podanej kolejności) podczas gdy rimocydyna hamowała wzrost drożdży. Reszta antybiotyków wykazała słabe działanie lub jego brak.

Według B i s s e t t a i T a r r a (1952) aureomycyna i terramycyna wpływają opóźniająco na rozwój, znajdujących się na rybach niektórych bakterii, nie niszczonych przez penicylinę i streptomycynę. O podobnych wynikach donosi artykuł redakcyjny „Gordian" (1952).

Nieliczne doniesienia dotyczą wpływu antybiotyków na drożdże i bakterie mlekowe oraz wywoływane przez nie fermentacje.

A h m a d i współpracownicy (1951) stwierdzili hamujący wpływ antymicyny A na wzrost *Saccharomyces cerevisiae* na podłożu syntetycznym.

Wzrost *Saccharomyces* bywa również hamowany przez antybiotyki takie jak aktidion (wg B e r n h a u e r a, 1950 i B e n e d i c t a, 1953), dalej przez flawacid, fradicynę, askozynę (wg B e n e d i c t a, 1953) i rimocydynę (T a r r i współpracownicy 1953).

Dodawanie ziarn gorczycy do świeżych soków owocowych powodowało zahamowanie fermentacji alkoholowej w skutek obecności izosiarkocyjanianu allylu w gorczycy (G a c h o t, 1950 wg B o g d a ń s k i e g o 1950, G a t ż i j e w, 1951, B o c h o n, 1951).

Oporność drożdży na działania penicyliny zaobserwował J u i l e r a t (1948), zalecając stosowanie jej do jałowego przechowywania hodowli drożdży. H e s s e l t i n e i współpracownicy (1952) stwierdzili, że aureomycynę można stosować jako czynnik selekcyjny i pomocny przy izolowaniu czystych kultur drożdży.

G o v e r n wraz z współpracownikami (1953) wykazali wzmożony rozwój drożdży w przewodzie pokarmowym dzieci, spowodowany przez podawanie aureomycyny i chloramfenikolu.

Według C h a t t a w a y'a i współpracowników (1949) ekstrakt drożdży znosi hamujące działanie penicyliny na rozwój niektórych bakterii.

Liczne prace natomiast znajdujemy na temat wpływu jaki antybiotyki, stosowane w leczeniu zapalenia wymion u krów, wywierają na mikroflorę mleka (C a l b e r t, 1953), (K a n e g i s i współpracownicy, 1953).

W czasie badań nad utrwalaniem mleka przy pomocy antybiotyków W i l k o w s k e i K r i e n k e (1951) ustalili hamujący wpływ penicyliny (1 j/ml) na rozwój bakterii mlekowych. Wymienieni autorzy nie polecają jednak tego związku do konserwacji mleka.

G r e e n e i B e l l (1953) wykazali hamujące działanie aureomycyny i terramycyny na wzrost bakterii mlekowych i produkcję kwasu.

O v e r b y i A n k e r (1953) stwierdzili zahamowanie wytwarzania kwasów w mleku przy zastosowaniu 0,02 mg aureomycyny, 0,2 mg chloramfenikolu, 0,04 mg streptomycyny lub 0,01 mg terramycyny na ml.

T h o m e (1953) zwraca uwagę na ujemne skutki leczenia krów antybiotykami ujawniające się przy produkcji serów. Według tego autora prawie wszystkie szczepy odgrywające rolę przy wyrobie serów, są wrażliwe na działanie penicyliny i dlatego też mleko leczonych krów nie powinno być używane (3 — 6 udojów) do produkcji serów.

METODY BADAŃ

Wpływ antybiotyków na badanie mikroorganizmy określano zmodyfikowaną metodą cylinderkową *) (K o r z y b s k i i K u r y ł o w i c z, 1949). Przy badaniu wpływu antybiotyków na fermentację posługiwano się ogólnie przyjętymi metodami badań procesów fermentacyjnych.

Tak więc dla ustalenia przebiegu fermentacji alkoholowej oparto się na dobowych wagowych pomiarach ubytków CO_2 z nastawów fermentacyjnych, potwierdzanych analizą na zawartość kwasów, alkoholu i cukru. Odnośnie fermentacji mlekowej i octowej oparto się na wynikach oznaczeń miareczkowych. Penicylinę, jako związek wrażliwy na działanie wyższej temperatury, dodawano sterylnie do jałowej pożywki natomiast aureomycynę sterylizowano wraz z pożywką. Kontrolę aktywności aureomycyny przeprowadzano metodą płytkową na szczepie *E. coli* **) przed i po sterylizacji, a także po skończonej fermentacji. Nastawy kontrolne oznaczano literą K, natomiast dawkowane antybiotykami oznaczano liczbami rosnącymi w miarę podwyższania dawek. Tabele przedstawiają średnie wyników dwóch powtórzeń.

Przy obu metodach (cylinderkowej i fermentacyjnej) posługiwano się pożywkami syntetycznymi. Do badań nad drożdżami stosowano zmodyfikowaną pożywkę Orla-Jensena (J ö r g e n s e n, 1940), w której 10 g glukozy i 10 g laktozy zastąpiono 20 g sacharozy. W badaniach nad fermentacją dodawano 25 g sacharozy na 100 ml wymienionej pożywki. (Ilość tę określono w wyniku uprzednich doświadczeń, mających na celu ustalenie optymalnej ilości sacharozy w pożywce syntetycznej).

*) Na zestalonym podłożu agarowym ustawiano cylinderki (nie standaryzowane) i napełniano je odpowiednim rozcieńczeniem penicyliny lub streptomycyny. Średniej strefy zahamowania nie mierzono, a wrażliwość szczepu na antybiotyk określano jakościowo.

**) Prof. Z. Przybyłkiewicz dziękuję za dostarczenie szczepu.

Wpływ antybiotyków na bakterie mlekowe badano jakościowo na pożywce Blickfeldta z kredą (J ö r g e n s e n, 1940). Fermentację mlekową prowadzono na tejże pożywce z pominięciem dodatku kredy. Ilość dodanej kredy i sacharozy zmieniano w zależności od celu doświadczenia.

Do badań nad bakteriami octowymi na podłożu stałym i płynnym stosowano pożywkę Henneberga (J ö r g e n s e n, 1940), dodając 3 ml 96% etanolu na 100 ml pożywki.

Do zaszczepiania pożywki płynnej drożdżami posługiwano się 5-dobową hodowlą *Saccharomyces cerevisiae* rasy „Steinberg" (prowadzoną u nas od 1947 roku) w ilości 1 ml na 100 ml pożywki.

Laseczki mlekowe (*Thermobacterium cereale*) rozmnażano na brzeczce słodowej o 8,5° Blg, wprowadzając do nastawów 2,5 ml 1-dobowej hodowli na 100 ml pożywki. *Th. cereale* wyizolowano z zakwasu gorzelniczego, otrzymanego z SGGW.

Nastawy fermentacji octowej szczepiono 1 ml 2-dobowej kultury *Acetobacter rancens* na 100 ml pożywki. *A. rancens* został wyizolowany z piwa i zidentyfikowany przez autorkę pracy.

Zawartość alkoholu oznaczano piknometrycznie w destylacie, kwasowość ogólną miareczkowo w przeliczeniu na kwas winowy, a cukier pozostały po fermentacji metodą Meisla-Ahlina.

Oznaczenie zawartości kwasu octowego wykonano według F i o d o r o w a (1950). Kwas mlekowy oznaczano prostą metodą opracowaną w Zakładzie Mikrobiol. Przem. G. I. P. R. i S. (R y c h l i k i N o w o t n y), polegającą na miareczkowym oznaczeniu kwasu w nastawie fermentacyjnym, zawierającym 100 ml pożywki z określoną ilością sacharozy i węglanu wapniowego. Po skończonej fermentacji dodaje się w pewnym nadmiarze kwas siarkowy, który wiąże wapń z kredy, odpędza się CO_2 przez dwukrotne podgrzanie, dodaje się fenolftaleinę jako wskaźnik i odmiareczkowuje nadmiar H_2SO_4 ługiem sodowym. Konieczne jest wykonanie oznaczeń w próbach ślepych, nie zawierających bakterii, w których ustala się ilość NaOH potrzebną do zobojętnienia nadmiaru kwasu. Wynik otrzymany z tej reakcji służy jako stały odjemnik od ilości ługu, użytego do zobojętnienia kwasoty sumarycznej w nastawach zaszczepionych. 1 ml 0,5 N NaOH odpowiada 45 mg kwasu mlekowego.

WYNIKI BADAŃ

WPŁYW PENICYLINY I AUREOMYCYNY NA DROŻDŻE

Penicylina

M e t o d a c y l i n d e r k o w a

Dawki penicyliny wynosiły: 2,5j — 25j — 250j — 2500j na 0,25 ml roztworu w każdym cylinderku. Płytki wstawiono do termostatu o temp. 25° i obserwowano wzrost drożdży po 24 godzinach inkubacji i później. Okazało się, że penicylina nie spowodowała zahamowania wzrostu drożdży. Badanie mikroskopowe nie wykazało zmian morfologicznych.

Metoda fermentacyjna

Fermentację przeprowadzono w 150 ml pożywki, dodając penicylinę w 4-ch dawkach: Nr 1 — 25j, Nr 2 — 250j, Nr 3 — 2500j, Nr 4 — 25000j. Przebieg fermentacji przedstawiają rys. 1 i tabela I.

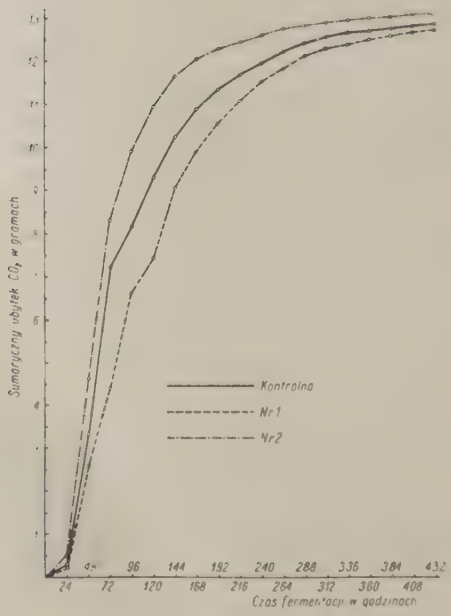
TABELA I

Wpływ penicyliny i aureomycyny na wytwarzanie alkoholu przez drożdże po 3 tygodniach fermentacji.

Влияние пенициллина и ауреомицина на образование алкоголя дрожжами после трехнедельной ферментации.

The influence of penicillin and aureomycin on the amount of acohol produced by yeast after 21 days of the fermentation

Penicylina					Aureomycyna			
Nr	Dawka w j/ml	Kwasowość ogólna w %	Alkohol w %	Cukier w %	Nr	Dawka w mg/ml	Kwasowość ogólna w %	Alkohol w % obj.
K	0,000	0,40	11,77	6,34	K	0,000	0,39	11,77
1	0,167	0,42	11,83	6,21	1	0,007	0,46	12,04
2	1,67	0,36	11,27	6,71	2	0,067	0,44	10,87
3	16,67	0,34	11,18	6,86	3	0,67	0,50	10,69
4	166,7	0,40	11,36	6,67	4	0,7	0,52	10,31



Rys. 1. Wpływ penicyliny na tworzenie alkoholu przez drożdże.

Рис. 1. Влияние пенициллина на образование алкоголя дрожжами после трехнедельной ферментации (контроль ——; № 1 - - - -; № 2 —.—.—)

Fig. 1 — The influence of penicillin on the ethanol production (—— — the control, - - - - - - dosis No 1, —.—.— dosis No 2)

Jak wskazują wyniki, penicylina w zasadzie nie wpływa na wynik fermentacji. Jednak w trzech pierwszych dniach tego procesu uwydatniają się pewne różnice widoczne na wykresie.

Uwzględniając wrażliwość roztworów penicyliny już na temperaturę pokojową, wykonano doświadczenie w dwóch seriach, z których pierwsza została wstawiona odrazu do termostatu, a drugą wstawiono uprzednio na 48 godzin do lodówki, celem poddania drożdży dłuższemu działaniu penicyliny w warunkach nie sprzyjających jej rozkładowi. Porównanie wyników obu serii nie wykazało różnic.

Doświadczenia na moszczu jabłkowym z penicyliną potwierdziły wyniki uzyskane na pożywce syntetycznej.

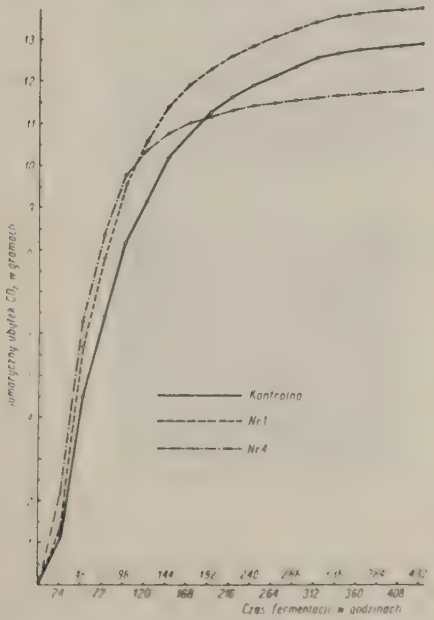
Aureomycyna

Metoda cylinderkowa

Dawki aureomycyny: 0,0017 mg — 0,017 mg — 0,17 mg — 1,7 mg na 0,25 ml zawartości cylinderka, nie powodowały zahamowania wzrostu drożdży.

Metoda fermentacyjna

Dawki: Nr 1 — 0,1 mg, Nr 2 — 1,0 mg, Nr 3 — 10 mg, Nr 4 — 100 mg na 150 ml pożywki. Przebieg fermentacji obrazują rys. 2 i tabela I.



Rys. 2. Wpływ aureomycyny na wytwarzanie alkoholu przez drożdże.
Рис. 2. Влияние ауреомицина на образование алкоголя дрожжами после трёхнедельной ферментации (—— контроль; ..... № 1, —— . .—— № 4)
Fig. 2 — The influence of aureomycin on the ethanol fermentation ——— control; - - - - - - dosis No 1, —..—..— dosis No 4

WPŁYW PENICYLINY NA LASECZKI KWASU MLEKOWEGO

Metoda cylinderkowa

Dolna warstwa agaru na płytce zawierała pożywkę Blickfeldta bez kredy, celem uzyskania przezroczystego tła, ułatwiającego obserwację ewentualnych stref zahamowania wzrostu. Górna warstwa zawierała pożywkę z kredą i laseczki Delbrücka. Dawki penicyliny wynosiły: 2,5j — 25j — 250j — 2500j na cylinderek. Płytki wstawiono do termostatu o temp. 40^0 i stwierdzono już po 12-tu jak również po 24-ech godzinach inkubacji wyraźne strefy zahamowania wzrostu (Fot. 1, 2, 3).

Metoda fermentacyjna

Dla celów porównawczych przeprowadzono fermentację mlekową w obecności 3-ch dawek penicyliny i różnych ilości sacharozy i $CaCO_3$ przy różnym czasie trwania fermentacji. Dawki penicyliny: Nr 1 — 10j, Nr 2 — 100j, Nr 3 — 1000j/100 ml pożywki. Tabela II zawiera wyniki oznaczeń zawartości kwasu mlekowego po 6 dniach fermentacji w nastawach zawierających 1 g sacharozy i 1,5 g kredy/100 ml oraz po 9 dniach fermentacji przy użyciu 2 g sacharozy i 0,5 g kredy.

Penicylina w dawkach stosowanych wpływa hamująco na proces fermentacji mlekowej (tab. II).

TABELA II

Wpływ penicyliny na wytwarzanie kwasu mlekowego przez *Th. cereale* po 6-ciu i 9-ciu dniach fermentacji.

Влияние пенициллина на образование молочной кислоты *Th. cereale* после шестидневной и девятидневной ферментации

The influence of penicillin on the lactic acid production by *Th. cereale* after 6 and 9 days of the fermentation

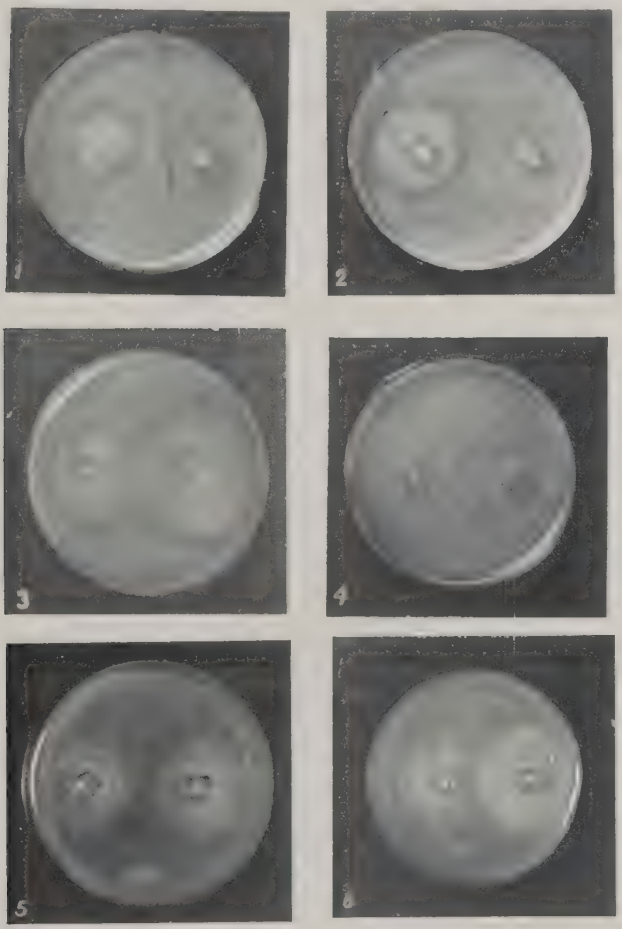
Po 6 dniach fermentacji			Po 9 dniach fermentacji		
Nr	dawka j/ml	% kwasu mlekowego	Nr	dawka j/ml	% kwasu mlekowego
K	0,00	1,07	K	0,00	0,73
1	0,10	0,62	1	0,10	0,64
2	1,0	0,51	2	1,0	0,41
3	10,0	0,41	3	10,0	0,38

WPŁYW AUREOMYCYNY NA LASECZKI KWASU MLEKOWEGO

Metoda cylinderkowa

Dawki aureomycyny: 0,0025 mg — 0,025 mg — 0,25 mg — 2,5 mg. Aureomycyna podobnie jak penicylina wywarła hamujący wpływ na wzrost *Th. cereale* (Fot. 4, 5, 6).

Strefy zahamowania wzrostu *Th. cereale* przez 4 dawki penicyliny.
Fot. 1. Dawka nr 1 i K. Fot. 2. Dawka nr 2 i K. Fot. 3. Dawka nr 3 i nr 4;
Зоны заторможения роста *Th. cereale* при применении пенициллина
Фот. 1. Доза № 1 и К; Фот. 2. Доза № 2 и К; Фот. 3. Доза № 3 и 4.
The inhibition of the growth of *Th. cereale* by penicillin.
Fig. 1. Dosis No 1 and K; Fig. 2. Dosis No 2 and K; Fig. 3. Dosis No 3 and 4.



Strefy zahamowania wzrostu *Th. cereale* przez 4 dawki aureomycyny.
Fot. 4. Kontrolna. Fot. 5. Dawka nr 2 i nr 3. Fot. 6. Dawka nr 1 i nr 4.
Зоны заторможения роста *Th. cereale* при применении ауреомицина
Фот. 4. Контрольная; Фог. 5. Доза № 2 и № 3; Фот. 6. Доза № 1 и № 4.
The inhibition of the growth of *Th. cereale* by aureomycin
Fig. 4. Control. Fig. 5. Dosis No 2 and 3. Fig. 6. Dosis No 1 and 4.

Metoda fermentacyjna

W badaniach nad fermentacją mlekową w obecności aureomycyny stosowano dodatek sacharozy i $CaCO_3$ w stosunku 1 : 1 100 ml. Fermentację przeprowadzono w 100 ml pożywki. Tabela III zawiera dane liczbowe zawartości kwasu mlekowego.

Metoda fermentacyjna potwierdziła zatem wyniki metody cylinderkowej.

TABELA III

Wpływ aureomycyny na wytwarzanie kwasu mlekowego przez *Th. cereale* po 10-ciu dniach fermentacji.

Влияние ауреомицина на образование молочной кислоты после десятидневной ферментации

The influence of aureomycin on the lactic acid production by *Th. cereale* after 10 days of the fermentation

Nr	Dawka mg/ml	% kwasu mlekowego
K	0,000	0,63
1	0,001	0,57
2	0,01	0,56
3	0,1	0,44
4	1,0	0,18

TABELA IV

Przebieg fermentacji octowej (*A. rancens*) w obecności 3% alkoholu.

Ход уксусной ферментации (*A. rancens*) в присутствии 3% алкоголя.

Acetic acid fermentation (*A. rancens*) in the presence of 3% of ethanol

Nr	Doby	% kwasu octowego
a	1	0,24
b	2	0,30
c	3	1,73
d	4	2,07
e	5	2,21
f	6	1,85
g	7	1,43
h	8	1,37

BADANIA NAD BAKTERIAMI OCTOWYMI

Wobec braku w literaturze danych na temat zachowania się *Acetobacter rancens* na podłożu syntetycznym, przeprowadzono szereg doświadczeń poprzedzających właściwe badania. Próby z antybiotykami przeprowadzono w kolbach stożkowych o pojemności około 500 ml, do których rozlewano pożywkę po 100 ml z dodatkiem 3 ml 96%-owego etanolu. Fermentację prowadzono w temp. 26^0 — 27^0. Próby rozpoczęto od ustalenia czasu trwania fermentacji octowej w obecności 3% alkoholu. Celem tego doświadczenia było także uchwycenie momentu rozpoczęcia nadoksydacji przez bakterie. Nowsze badania wykazały bowiem, że ta właściwość bakterii octowych może ulegać zmianie w zależności od środowiska (Szaposznikow, 1951). Tabela IV przedstawia wyniki oznaczeń na zawartość kwasu octowego w ciągu 8 dni fermentacji. W obecności 3% alkoholu w pożywce Henneberga kwasowość wzrastała przez 5 dni, po upływie których spadała. Dalsze doświadczenia prowadzono przez 5 dni. Gdy w osobnej próbie obserwowano fermentację z dodatkiem 5% alkoholu okazało się, że kwasowość stale podnosiła się w ciągu kilkunastu dni, po upływie których utrzymywała się już na stałym poziomie. Te wstępne doświadczenia potwierdziły wyniki Dratwiny (wg Szaposznikowa, 1951), we-

dług której zawartość kwasu octowego w brzeczce + 3% alkoholu rosła również do maksimum nie dając po jego osiągnięciu spadku zawartości kwasu octowego. Badania te świadczą o tym, że zdolność nadmiernego utleniania przez *A. rancens* jest cechą uzależnioną od warunków środowiskowych.

Następnie przystąpiono do ustalenia wytrzymałości *A. rancens* na różne stężenia alkoholu w pożywce syntetycznej. W tym celu przeprowadzono fermentacje z dodatkiem 4%, 6%, 8%, 10% i 12% alkoholu. Obserwacja wzrostu błony i oznaczenia miareczkowe wykazały, że przy zawartości 4% i 6% alkoholu błona na powierzchni pożywki pojawiła się najwcześniej, podczas gdy przy koncentracjach 10% i 12% nie wystąpiła wcale. Wzrostowi błony towarzyszyło wytwarzanie kwasu. Tabela V przedstawia wyniki oznaczeń. Okazało się, że 6% alkoholu jest optymalną koncentracją dla rozwoju *A. rancens* i produkcji kwasu.

TABELA V

Wytwarzanie kwasu octowego przez *A. rancens* w ciągu 5-ciu dni fermentacji w zależności od koncentracji alkoholu w pożywce

Образование уксусной кислоты *A. rancens* в течение 5-и дней ферментации в зависимости от концентрации алкоголя в среде.

The acetic acid production by *A. rancens* in media with various ethanol concentration (incubation — 5 days)

Nr	% alkoholu	% kwasu octowego	Smak
A	4	2,87	silnie kwaśny
B	6	3,88	b. silnie kwaśny
C	8	0,89	słabo kwaśny
D	10	0,24	alkoholowy
E	12	0,24	alkoholowy

W celu określenia wpływu zmiany pożywki na bakterie, bakterie z hodowli na różnych stężeniach etanolu przeszczepiono na podłoże z dodatkiem 3% alkoholu. Tabela VI podaje zawartość kwasu wytworzonego w nowej pożywce.

Rozwój *A. rancens* został zahamowany przez wyższe stężenie alkoholu, jednak bakterie wytrzymują nawet 12%-owe jego stężenie w podłożu, gdyż przeniesione do odpowiedniego środowiska rozwijają się doskonale i są zdolne do wytwarzania błony i kwasu octowego. Potwierdza to wyniki Henneberga (1926), według którego dopiero 13% alkoholu działa bakteriobójczo na *A. rancens* po upływie 48 godzin.

TABELA VI

Wytwarzanie alkoholu przez *A. rancens*, hodowany uprzednio na różnych koncentracjach alkoholu, po przeszczepieniu do podłoża o zawartości alkoholu równej 3%

Образование уксусной кислоты *A. rancens*, культивированным предварительно на различных концентрациях алкоголя, после пересева на среду, содержащую 3% алкоголя

The influence of the adaptation of *A. rancens* to various concentration of ethanol on the production of acetic acid in normal medium (3% of alcohol)

Nr	% alkoholu w poprzedniej pożywce	% kwasu octowego
A_I	4	1,25
B_I	6	1,91
C_I	8	1 31
D_I	10	1,97
E_I	12	2,03

TABELA VII

Wytwarzanie kwasu octowego przez *A. rancens* w ciągu 5-ciu dni na podłożu o różnych koncentracjach glukozy

Образование уксусной кислоты *A. rancens* в течение 5 дней на среде с разными концентрациями глюкозы

The influence of the glucose-concentration upon the acetic acid production by *A. rancens*

Nr	Zawartość glukozy w g/100 ml	% kwasu octowego
1	4	1,61
2	6	2,03
3	8	2,39
4	10	2,60

WPŁYW PENICYLINY NA BAKTERIE OCTOWE

Metoda cylinderkowa

Dawki: 1,7j — 17j — 170j — 1700j na 0,25 ml zawartości cylinderka. Po 24-ch godzinach inkubacji (a także po dłuższej obserwacji) nie stwierdzono zahamowania wzrostu bakterii.

Metoda fermentacyjna

Z powodu wrażliwości penicyliny na alkohol, przeprowadzono równoległe fermentacje w obecności glukozy. Oba te związki są dobrze wykorzystywane przez bakterie. Równocześnie, jak w doświadczeniach z drożdżami, prowadzono próby w dwóch seriach: wstawianą odrazu do termostatu, i przetrzymywaną uprzednio w lodówce. Badania rozpoczęto od ustalenia potrzebnego stężenia glukozy do uzyskania przybliżonej koncentracji kwasu, otrzymywanej z 3% alkoholu w pożywce. Tabela VII daje obraz przebiegu fermentacji octowej w zależności od stosowanych ilości glukozy. Na podstawie otrzymanych wyników w następnych doświadczeniach stosowano 6 g glukozy na 100 ml.

FERMENTACJA OCTOWA NA GLUKOZIE W OBECNOŚCI PENICYLINY

Fermentację przeprowadzono w 100 ml pożywki stosując dawki: Nr 1 — 17j, Nr 2 — 170j, Nr 3 — 1700j, Nr 4 — 17000j penicyliny. Wyniki fermentacji przeprowadzanych również w dwóch seriach nie różniły się między sobą tab. VIII.

TABELA VIII

Wytwarzanie kwasu octowego przez *A. rancens* w obecności penicyliny i aureomycyny
Образование уксусной кислоты *A. rancens* в присутствии пенициллина и ауреомицина
The influence of penicillin and aureomycin on the acetic acid production by *A. rancens*

Penicylina						Aureomycyna		
na podłożu z glukozą			na podłożu z etanolem					
Nr	dawka j/ml	% kwasu octowego	Nr	dawka j/ml	% kwasu octowego	Nr	dawka mg/ml	% kwasu octowego
K	0 000	1 85	K	0.000	2.12	K	0 0000	2.57
1	0,167	1.85	1	0,167	2,03	1	0.0001	2.66
2	1.67	1,82	2	1.667	2,15	2	0,001	2,45
3	16,7	1.85	3	16,670	2,09	3	0,01	2,51
4	167,0	1,85	4	166,70	2,15	4	0,1	1,88

WPŁYW AUREOMYCYNY NA BAKTERIE OCTOWE

Metoda cylinderkowa

Dawki: 0,0025 mg — 0,025 mg — 0,25 mg — 2,5 mg. Po 24 godzinach i później nie stwierdzono zahamowania wzrostu bakterii przez stosowane dawki. Zastosowano również dawkę 10 mg na cylinderek. W tym przypadku aureomycyna okazała się czynna wywołując wąską strefę zahamowania.

Metoda fermentacyjna

Na 100 ml podłoża dodano następujące ilości aureomycyny: Nr 1 — 0,01 mg, Nr 2 — 0,1 mg, Nr 3 — 1,0 mg, Nr 4 — 10 mg. Na powierzchni płynów fermentacyjnych po 24 godzinach powstała błona w próbie kontrolnej i zadanej najniższą dawką. Po 3-ch dobach wzrost bakterii w postaci błony wystąpił jednak również w innych nastawach, przy czym błona odróżniała się perforacjami. Tabela VIII podaje zawartość kwasu octowego po 5 dobach fermentacji.

Przy bardzo niskich dawkach aureomycyny można było obserwować przemijające zahamowanie wzrostu bakterii octowych w pierwszym

stadium fermentacji. Dawka najwyższa wykazała wyraźny spadek zawartości kwasu.

Z badań powyższych wynika, że: 1) penicyliną i aureomycyną można się posługiwać przy izolowaniu czystych kultur drożdży, 2) penicylina i aureomycyna nadają się do hamowania fermentacji mlekowej i wzrostu bakterii mlekowych, 3) aureomycyna może służyć jako czynnik hamujący fermentację octową.

Stosowanie antybiotyków do konserwacji żywności napotyka jednak na trudności. Wprawdzie toksyczność wielu antybiotyków jest bardzo mała, a niektóre są zupełnie nietoksyczne dla człowieka, zastosowane do konserwacji produktów spożywczych wykazują jednak własności selektywne, atakując tylko pewne określone drobnoustroje. Celowość zatem stosowania tych substancji do konserwacji żywności jest więc przedmiotem dyskusji, bowiem środki spożywcze zawierają zawsze zespół różnych drobnoustrojów często systematycznie odległych od siebie. Wynika z tego konieczność stosowania mieszanin antybiotyków, co z kolei może budzić zastrzeżenia natury ekonomicznej. Należy też zwracać uwagę na zależność jaka może zachodzić między stałym spożywaniem konserw utrwalonych antybiotykami, a metabolizmem drobnoustrojów jelitowych, a szczególnie syntezą witamin. O takiej zależności świadczą wyniki pracy G o v e r n a i współpracowników (1953) nad zmianami mikroflory przewodu pokarmowego dzieci leczonych aureomycyną i chloramfenikolem. Okazało się, że ilość gramdodatnich i gramujemnych bakterii znacznie się zmniejszyła, natomiast bujnie rozwinęła się mikroflora grzybkowa, włączając drożdże i różne odmiany *Candida*. Dlatego przy stosowaniu antybiotyków do konserwacji, winno przeprowadzać się odpowiednią kontrolę farmakologiczną.

Dr K. Matuszakowi, Kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej w Krakowie, który zainicjował powyższe badania i służył mi cennymi radami i wskazówkami, składam serdeczne podziękowania. P. Irenie Chmurowej dziękuję za pomoc techniczną.

E. Коцова

ВЛИЯНИЕ ПЕНИЦИЛИНА И АУРЕОМИЦИНА НА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE, THERMOBACTERIUM CEREALE* И *ACETOBACTER RANCENS*

Резюме

Пенициллин и ауреомицин не оказывали влияния на дрожжи расы „Штейнберг" (167 единиц на 1 мл). Ауреомицин в концентрации 0.1 мг/мл давал слабо стимулирующий эффект. Рост *Th. cereale* прекратился уже при дозе 0.1 ед./мл. Тормозяще действовал также и ауреомицин. *Acetobacter rancens* проявил устойчивость против пенициллина. Ауреомицин действовал в концентрации 0.1 мг/мл.

E. Kocwowa

THE INFLUENCE OF PENICILLIN AND AUREOMYCIN ON THE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE, THERMOBACTERIUM CEREALE* AND *ACETOBACTER RANCENS.*

Summary

In these investigation the influence of penicillin and aureomycin on „Steinberg" — yeast, *Thermobacterium cereale* and *Acetobacter rancens* was determined by two methods. No effect of penicillin was observed on yeast either on solid or in liquid medium. The author found low stimulating effect of aureomycin in dose 0,007 mg/ml on yeast in liquid medium. It was also found inhibition of the growth *Th. cereale* by penicillin (0,1 i. u./ml) in solid as well as in liquid medium. This strain was also susceptible to the influence of aureomycin. Penicillin was inactiv against *A. rancens*. Aureomycin in concentration higher than 0,1 mg per ml exerts an inhibiting effect on this bacteria.

LITERATURA

1. Adams A., Ayres J., Tischer R. a. Ostle B. 1953: Effect of substilin on spoilage of thermal processed beef., *Biol. Abstr. Sect. C.* Nr 5.
2. Ahmad, Kamaluddin, Schneider H. a. Strong F. 1951: Studies on the biological action of antimycin A., *Biol. Abstr. Sect. C,* Nr 2.
3. Alkiewicz J. i Graczykówna Z. 1952: O działaniu hamującym pałeczki ropy błękitnej na rozwój kropidlaka (*Aspergillus fumigatus*)., *Med., Doświadcz. i Mikrobiol.,* Nr 2.
4. Artykuł redakcyjny „Gordian", 1951: Probleme der Haltbarmachung, 50, Nr 1203—1209.
5. Artykuł redakcyjny „Gordian", 1952: Antibiotica als Konservierungsmittel auf dem Lebensmittelgebiet, 52, Nr 1241.
6. Artykuł redakcyjny „Przemysł Rolny i Spożywczy", 1950; Antybiotyki jako konserwanty żywności, Nr 12, 407.
7. Artykuł redakcyjny „Przemysł Rolny i Spożywczy", 1951: Zabezpieczenie mięsa przy pomocy antybiotyków, Nr 7/8, 333.
8. Benedict R. G., 1953: Antibiotics Produced by Actinomycetes., *The Botan. Rev*, Nr 5.
9. Ber A., 1950: Hormony wzrostu roślin zielonych, grzybów i bakterii., Książka i Wiedza, Warszawa.
10. Bernhauer K., 1950: Antibiotica. Ergebnisse der Enzymforschung, **11**: 389, Leipzig.
11. Bissett H. a. Tarr H., 1952: Stability of antibiotics when used in experimentally retarding fish spoilage., Progress Rep., Pac. Coast. St. Fisheries, Res., Canada, Nr 93.
12. Bochon M., 1951: Jus de raisin a la moutarde., Raisins et Fruits de France, **8**, Nr 23.
13. Bogdański K., 1950: Nowy sposób konserwowania moszczy owocowych, *Przem. Rolny i Spoż.,* Nr 4.
14. Briggs Ph. a. Hanel E., 1950: Control of mold contaminants on solid media by the use of actidione., *J. Bact.,* **60**: 104.

15. Bylicka H., Jarosz B., Nowicka I. i Kunicki-Goldfinger W ł., 1952: Substancje antybiotyczne porostów. Cz. I. *Acta Microbiol. Polon.*, **1**: 3.
16. Calbert H., 1953: The problem of antibiotics in milk., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 11.
17. Chattaway F., Hall D., Happold F. a. Haldsworth E., 1949: Reversal of penicillin inhibition by a yeast extract., *Nature*, **164**.
18. Dehut M. V., 1951: Antiseptiques-conservanteurs et tutti quanti dans les matieres alimentaires., *Vita*, Nr 4, Nr 5.
19. Edson, Seton N., Thornton G. D. a. Smith F. B., 1951: Antibiotic action of *Streptomyces albus* against mold decay organisms of citrus fruits., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 2, s. 539.
20. Fiodorow M. W., 1950: Rukowodstwo k prakticzeskim zaniatiam po mikrobiołogii., Moskwa.
21. Fiodorow M. W., 1952: Mikrobiologia, PWRiL Warszawa.
22. Gatżijew D. M., 1951: Gorczicznyj żmych dla konsierwirowania winogradnogo soka., *Widon.* i *Winograd.* SSSR, Nr 1.
23. Greene W. W. a. Bell J. M., 1953: Preserving raw milk with various antibiotic preparations., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 7.
24. Govern Mc J., Parrot R., Emmous Ch. W., Ross S., Burke F. a. Rice C l., 1953: The effect of aureomycin and chloramphenicol on the fungal and bacterial flora of children., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 8, s. 2151.
25. Hesseltine C. W., Hauck M., Ten Hagen T. a. Bochonos M., 1952: Isolation and Growth of Yeast in the Presence of Aureomycin., *J. Bact.*, **64**:55.
26. Jörgensen A., 1940: Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie, Jena.
27. Juilerat A., 1948: Drożdże. Działanie penicyliny. wg *Przem. Ferment.*, **4**: 12.
28. Kanegis L. A., Tonelli G. a. Falk H., 1953: Aureomycin milk and serum concentrations in dairy cows., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 9.
29. Korzybski T. i Kuryłowicz W ł., 1949: Metody badania penicycliny, Prasa Wojsk. Warszawa.
30. Leben C., Stessel G. J. a. Keitt G. W., 1952: Helexin, an antibiotic active against certain fungi and bacteria., *Mycol.* Nr 2.
31. Loefer J. B., Bieberdorf F. W. a. Weichlein R. G., 1953: Inhibition and enhancement of the growth of fungi with streptomycin., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 9.
32. Michalska K., 1953: Wpływ streptomycyny na wytwarzanie kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger.*, *Med. Dośw.* i *Mikrobiol.*, Nr 1.
33. Morse R., 1950: Canning with antibioticts — pro and con., *Food Industries*, 40.
34. Overby, Anker, J., 1953: The effect of various antibiotics in milk following intramammary infusion., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 7.
35. Rychlik i Nowotny: informacja osobista.
36. Stessel G. J., Leben C. a. Keitt G. W., 1952: Studies on an antifungal antibiotic produced by *Bacillus subtilis.*, *Biol. Abstr. Sect.* D, Nr 11.
37. Schelhorn, 1952: Verwendung von Antibiotics bei der Lebensmittelkonservierung., *Obst-Gemüse-Verw.* Ind., **37**.
38. Szymona M., 1952: Wpływ filoncydów *Allium sativum* na wzrost i oddychanie niektórych grzybów chorobotwórczych., *Acta Microbiol. Polon.*, **1**: 5.

39. Tarr H. L. A., Southcott B. A. a. Bisset H. M., 1953: Experimental preservation of fresh foods with antibiotics., *Biol. Abstr., Sect. C*, Nr 1, s. 185.
40. Thanos, Andrev, 1952: Effect of cycloheximide (Actidione) and some anvironmental factors on the germination of spores of *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinnerea., Biol. Abstr. Sect. D*, Nr 11.
41. Thome K. E., 1953: Wpływ antybiotyków na wyrób serów. *Przem. Rolny i Spoż.*, Nr 8, s. 289.
42. Tilgner D. J., 1951: Stosowanie antybiotyków do konserw., *Przem. Rolny i Spoż.*, Nr 7—8.
43. Tokin B. P., 1951: Fitoncydy. Wyd. Ak. Nauk SSSR, Moskwa.
44. Wallen V. R. a. Skocko A. J., 1951: Activity of antibiotics against *Ascophyta pisi., Canad. Jour. Bact.*, 29(4) 3-316-323.
45. Wilkowske H. a. Krienke W. H., 1951: Influence of penicillin in milk on total and coliform bacteria plate counts., *Biol. Abstr. Sect. C*, Nr 11.
46. Winter A. G. u. Willeke L., 1951: Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen. Leicht flüchtige Hemmstoffe der Ranunculaceaen. *Naturwissenschaften*, **38**.
47. Henneberg W., 1926: Handbuch der Gärungsbakteriologie, B. II.
48. Prost E., 1953: Badania nad zastosowaniem antybiotyków w produkcji konserw mięsnych. *Acta Microb. Polon.* **2** : 168.
49. Szaposznikow W., 1951: Mikrobiologia techniczna. PWR i L. W-wa.

A. Horubała

KWAS CYTRYNOWY JAKO CZYNNIK MODYFIKUJĄCY PRZEBIEG FERMENTACJI KAPUSTY

Z Katedry Przemysłu Rolno-Spożywczego SGGW w Warszawie
Wpłynęło dnia 12.V.1954 r.

I. WSTĘP

Zagadnienie podniesienia jakości kapusty kiszonej jest jednym z ważniejszych w technologii żywności, albowiem konserwa ta jest produktem masowego spożycia, a jej wartości odżywcze są szczególnie cenne ze względu na stosunkowo wysoką zawartość kwasu askorbinowego. Nasza kapusta rynkowa pod względem jakości pozostawia przeważnie wiele do życzenia, gdyż jej wartości odżywcze są znacznie obniżone, a smak oraz zapach często wadliwe. Świadczy to o błędach w technice produkcyjnej i o braku należytego rozpracowania tego zagadnienia przez naukę. Jednym z trudniejszych zagadnień jest sprawa uzyskania właściwego, przyjemnego aromatu kapusty kiszonej. Dotychczas najlepszą kapustę z aromatem otrzymuje się przez kombinowaną fermentację bakteriami kwasu mlekowego typu homofermentatywnego i heterofermentatywnego. Bakterie homofermentatywne dają odpowiednie stężenie kwasu mlekowego, a heterofermentatywne, obok kwasu mlekowego, wytwarzają nieco lotnych produktów, na ogół korzystnie wpływających na aromat. Nawet najlepiej ukiszona w ten sposób kapusta nie odznacza się jednak w pełni przyjemnym aromatem.

Jednym ze znanych składników aromatu w produktach żywnościowych, powstających na drodze fermentacji jest dwuacetyl ($CH_3COCOCH_3$). Zainteresowanie się chemików żywnościowych dwuacetylem, jako substancją aromatyzującą produkty żywnościowe datuje się od czasu prac van Niela, Kluyvera i Derxa (1929) oraz Schmalfussa i Barthmayera (1929). Największa ilość prac dotyczy mleczarstwa, a w szczególności — ukwaszania śmietany do wyrobu masła. Stwierdzono przy tym dodatni wpływ kwasu cytrynowego i cytrynianu na tworzenie dwuacetylu (Tempelton i Sommer, 1935 oraz Michaelian i Hammer, 1938). Przy naturalnej fermentacji śmietany bakterie kwasu mlekowego korzystają z kwasu cytrynowego znajdującego się zawsze w mleku w drobnych ilościach. Dodatek kwasu cytrynowego w ilościach 0,15% (Prill i Hammer, 1939)

lub 0,1 do 0,4% (Raffey wg Tempelton i Sommer, 1935) wzmaga w dużym stopniu tworzenie się dwuacetylu.

Dwuacetyl powstaje w środowisku kwaśnym. Optymalne pH dla tworzenia acetoiny wynosi około 4,0 (Michaelian, Hoeker i Hammer 1938 i Virtanen, Kontio, Stargärds, 1941).

Macierzystą substancją dwuacetylu jest acetylo-metylo-karbinol $CH_3CHOHCOCH_3$ zwany krócej acetoiną. Acetoina może być wytwarzana przez systemy enzymatyczne zarówno drobnoustrojów (bakterie, drożdże) jak i roślin wyższych oraz zwierząt.

Zwykle obok dwuacetylu i acetoiny w układach biologicznych spotykamy, 2,3-butylenoglikol $CH_3CHOHCHOCH_3$. Te trzy związki mogą wzajemnie przechodzić jedne w drugie, przy czym regulatorem ich wzajemnego stosunku jest potencjał oksydoredukcyjny oraz odpowiedni system enzymatyczny.

Bakterie wytwarzające dwuacetyl należą do rodzaju *Betacoccus* względnie *Leuconostoc*. *Betacoccus cremoris* oraz *Betacoccus bovis* (Orla-Jensen) są powszechnie stosowane jako składnik aromatyzującej mikroflory zakwasów mleczarskich. Naturalnym środowiskiem ich bytowania są rośliny. Stąd też wyizolowano je i zastosowano do produkcji zakwasów mleczarskich (Matuszewski, Pijanowski, Supińska, 1936). Drobnoustroje tej grupy występują również jako naturalne składniki mikroflory fermentującej kapusty (Pederson, 1930).

Mechanizm powstawania acetoiny nie został dotychczas bezspornie wyjaśniony i rola kwasu cytrynowego w tym procesie nie jest jasna.

Dotychczasowe badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi na to zagadnienie. Niezbicie zostało stwierdzone tylko, że kwas cytrynowy lub cytryniany wpływają zarówno na szybkość tworzenia acetoiny, jak i na jej ilość.

Zadaniem tej pracy było polepszenie zapachu kapusty kiszonej przez wytworzenie odpowiedniej ilości dwuacetylu i acetoiny. Dodatek cytrynianu sodu miał pobudzać drobnoustroje fermentującej kapusty do wytwarzania tych substancji.

II. POSTĘPOWANIE I METODY

Kapustę odmiany Amager, o głowach zwartych, średniej wielkości obierano z wierzchnich liści i krajano razem z głąbami na szatkownicy na wiórki grubości 1 — 3 mm. Poszatkowaną kapustę zadawano solą kuchenną w ilości około 2,4% i po dokładnym wymieszaniu natychmiast ładowano do słoików szklanych, ze szkła bezbarwnego, o pojemności 2 litrów, w ilości po 1100 g. Na ubitą powierzchnię kapusty nakładano siatkę z muślinu i następnie tłoczek drewniany z otworkami (tłoczek miał średnicę nieco mniejszą od słoja). Tłoczek przyciskano korkiem zamykającym słoik z taką siłą, aby warstwa soku znajdującego się ponad krążkiem wynosiła 15 — 20% objętości całej masy fermentującej. Otworki w tłoczku umożliwiały dyfuzję pomiędzy warstwą soku znajdującą się ponad krążkiem a główną masą fermentującą. Korek zaopa-

trzony był w czop fermentacyjny (rurka Nesslera) napełniony 40%-owym H_2SO_4 w celu kontrolowania ilości wydzielanego CO_2. Ponadto w korku znajdował się zamykany otwór służący do pobierania prób podczas fermentacji. W niektórych słoikach umieszczono termometry dla kontroli temperatury fermentującej masy. Korek łącznie z brzegami był dokładnie zaparafinowany. Przed załadowaniem do naczyń, a po dodaniu NaCl pobierano średnią próbę w celu oznaczenia suchej masy, ilości cukrów bezpośrednio redukujących i po inwersji, ilości substancji azotowych i kwasu askorbinowego. Cytrynian sodu dodano w postaci roztworu wodnego w ilościach od 0,05 do 0,4% w stosunku do fermentującej masy. Fermentację przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Dla każdej kombinacji w serii przygotowano po trzy równoległe słoje. Jeden z nich służył do obserwowania zmian kwasowości, stężenia NaCl i zmian morfologicznych drobnoustrojów fermentującej masy, a dwa następne — do kontrolowania ubytków wagowych, oraz po ukończonej fermentacji — do wykonania w nich pełnej analizy. Główną uwagę w końcowej analizie chemicznej kiszonki zwrócono na te związki powstałe pod wpływem fermentacji, które bezpośrednio lub pośrednio wpływać mogą na aromat gotowej konserwy. Oznaczano więc, między innymi, dwuacetyl, acetoinę, 2,3-butylenoglikol, alkohol etylowy, aldehydy, kwasy lotne, estry i acetale.

METODY ANALITYCZNE

1. Suchą masę oznaczano przez dwustopniowe suszenie w temperaturze 50 — 60° i 100 — 105° (P i j a n o w s k i, 1951).

2. Cukry oznaczano metodą Lane-Eynona, a inwersję sacharozy przeprowadzano metodą Clerget-Damüllera (Kalendarz Techniczny, 1949.)

3. Kwasowość ogólną — oznaczano przez miareczkowanie. W czasie fermentacji 2 ml soku miareczkowano z pomocą 0,05 N NaOH, a w produkcie gotowym miareczkowano 25 ml soku 0,25 N NaOH. Jako indykatora używano papierka lakmusowego.

4. Kwasy lotne uzyskiwano przez destylowanie z parą wodną 25 ml soku aż do zebrania 200 ml destylatu. Destylat po zagotowaniu miareczkowano 0,1 N NaOH wobec fenolftaleiny.

5. Kwas mlekowy oznaczano w roztworze pozbawionym białek i węglowodanów. Kwas mlekowy utleniano ostrożnie do aldehydu octowego przy pomocy 0,01 N $KMnO_4$, a aldehyd oddestylowywano do roztworu kwaśnego siarczynu sodu. Po ukończonej destylacji nadmiar siarczynu wiązano przy pomocy jodu. Siarczynowe połączenia aldehydu rozkładano przy pomocy sody ($NaHCO_3$) i uwolniony siarczyn odmiareczkowano 0,01 N jodem w obecności skrobi. Wynik podano w g kwasu mlekowego na 100 ml (M i e s z k o w a i S e w e r i n, 1950).

6. Substancje azotowe — oznaczano metodą Kjeldahla i ilość otrzymanego azotu mnożono przez 6,25 celem obliczenia ilości białka surowego (P i j a n o w s k i, 1951).

7. Alkohol etylowy — 50 ml zobojętnionego soku destylowano do objętości 50 ml. W destylacie oznaczono alkohol metodą piknometryczną.

8. Estry lotne — 25 ml soku destylowano z parą wodną do objętości 200 ml. 100 ml zobojętniano wobec fenolftaleiny i alkalizowano przez dodanie 7 ml 0,1 N NaOH. Ogrzewano pod chłodnicą zwrotną na wrzącej łaźni wodnej przez godzinę. Nadmiar ługu odmiareczkowano i różnicę wyważono, jako mg % octanu etylu.

9. Estry ogółem — 25 ml soku zobojętniano wobec papierka lakmusowego i alkalizowano z pomocą 10 ml 0,1 N NaOH. Po 24 godzinach nadmiar ługu odmiareczkowano. Różnice wyrażono jako mg% octanu etylu.

10. Aldehydy lotne — oznaczano metodą jodometryczną (Frołow — Bagrejew, 1951). Z lekko alkalicznego roztworu, celem zapobieżenia zmydlenia acetali, aldehyd oddestylowywano do roztworu siarczynu sodowego. Z ilości związanego siarczynu sodu obliczano zawartość aldehydów i wynik podano w mg% w przeliczeniu na aldehyd octowy.

11. Acetale — oznaczano w roztworze pozostałym po oddestylowaniu aldehydów. Po zmydleniu ich w środowisku kwaśnym oddestylowano, jak w pkt. 10 i wynik podano w mg% w przeliczeniu na $CH_3CH(C_2H_5O)_2$ (Frołow-Bagrejew, 1951).

12. Kwas askorbinowy oznaczano metodą Tillmansa w modyfikacji Dewiatnina i Doroszenki (Cerewitinow, 1949).

13. Kwas cytrynowy oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu bezwodnika kwasu octowego i pirydyny (Babad i Strikmann, 1951).

14. Dwuacetyl — oddestylowano zgodnie z przepisem Kniphorsta i Kruisheera (1937) i w destylacie oznaczano dwuacetyl sposobem kolorymetrycznym wg Pijanowskiego (nieopublikowane). Przy ogrzewaniu w środowisku alkalicznym powstaje żółte zabarwienie na skutek kondensacji dwuacetylu do związków o charakterze chinonów. Natężenie barwy mierzono przy pomocy fotokolorymetru Leitza. Wynik obliczano na podstawie krzywej wykreślanej dla roztworów standartowych.

15. Acetoinę przeprowadzano w dwuacetyl metodą Kniphorsta i Kruisheera (1937) przez utlenianie przy pomocy $FeSO_4$ i $FeCl_3$. Dalej postępowano jak przy dwuacetylu.

16. 2,3-butylenoglikol — określano metodą Kniphorsta i Kruisheera (1937) przez utlenienie do acetoiny bromem a następnie do dwuacetylu przy pomocy $FeSO_4$ i $FeCl_3$. Dalej postępowano jak przy dwuacetylu.

Doświadczenia z kiszeniem kapusty przeprowadzano w trzech seriach — jedną w zimie 1951/52 oraz dwie w zimie 1952/53.

III. UZYSKANE WYNIKI

ANALIZA SUROWCA

Surowiec użyty do kiszenia wykazał następujący skład chemiczny:

Z danych zawartych w tab. I wynika, że kapusta poddawana kiszeniu nie wykazuje istotnych różnic w porównaniu z ogólnie przyjętymi war-

TABELA I

Skład chemiczny surowca (liści kapusty)

Химический состав сырья (листья капусты)

Analysis of the cabbage-leaves.

Seria	Data pobrania prób i analiz	Sucha masa %	Cukry bezp. reduk. (jako cukier inwert.) %	Cukry po inwersji (jako cukier inwert.) %	Kwasowość (jako kwas mlekowy) %	Witamina C mg %
1952/53	15/XI	11,09	2,92	3,24	0,115	31,7
1952/53	20/I	11,60	3,55	4,10	0,16	16,0

tościami badanych składników. Różnice w zawartości kwasu askorbinowego tłumaczyć można stratami tego składnika powstałymi podczas przechowywania.

Analizy mikrobiologicznej surowca nie przeprowadzano.

2. KONTROLA PRZEBIEGU FERMENTACJI

Obserwowanie przebiegu fermentacji wykazało, że próby z dodatkiem cytrynianu dają niższe ubytki wagowe. Najniższe straty zaobserwowano przy dawkach 0,2 — 0,3% cytrynianu sodu. Największe straty wagowe, będące wyrazem wydzielania CO_2, przypadają na pierwsze dni fermentacji. Przeciętnie około 70% strat przypada na pierwsze pięć dni. Jest to teoretycznie całkowicie uzasadnione. Straty te powstają bowiem w głównym stopniu wskutek intensywnych procesów respiracyjnych tkanek roślinnych (V i r t a n e n, 1934) oraz na skutek rozwoju mikroflory wytwarzającej duże ilości gazów. Niższe ubytki wagowe w próbach z dodatkiem cytrynianu pozostają prawdopodobnie w związku z szybszym procesem zakwaszania środowiska, jaki dał się tam zaobserwować. Szczególnie wyraźne różnice w zawartości kwasów przypadają na pierwsze dni fermentacji. W niektórych wypadkach kwasowość prób z dodatkiem cytrynianu przewyższa prawie dwukrotnie kwasowość prób kontrolnych. W następnych dniach fermentacji różnice te powoli zmniejszają się. Próby z cytrynianem sodu wykazują jednak podczas fermentacji zawsze wyższą kwasowość niż próby kontrolne. Widzimy to na tab. II ilustrującej różnice w przyrostach kwasowości pomiędzy próbą kontrolną przyjętą za równą zeru, a próbami z cytrynianem sodu.

Wyraźnej współzależności pomiędzy dawkami cytrynianu sodu a szybkością przyrostu kwasowości nie dało się ustalić.

Równolegle z szybszym zakwaszaniem środowiska następowały zmiany w układzie mikroflory. Charakterystyczne dane, dotyczące zmian w układzie mikroflory, uzyskane przez bezpośrednie liczenie pod mikroskopem przedstawia tab. III.

Wyniki analiz mikroflory są na ogół zgodne z faktem dawno zaobserwowanym, że w pierwszym stadium ukwaszania przewagę mają formy typu paciorkowców. W miarę przyrostu kwasowości stosunek pa-

TABELA II

Przyrosty kwasowości próby kontrolnej przyjętej za zerową i prób z cytrynianem sodu, wyrażone w g kwasu mlekowego na 100 ml.

Повышение кислотности контрольной пробы, принятой за нулевую и проб с добавкой лимонокислого натрия, выраженное в граммах молочной кислоты на 100 мл.

The increase in the acidity of the samples of „sauerkraut" with citrate added, as compared with the control sample (expressed in grams of lactic acid per 100 ml)

Dodatek cytrynianu sodu %	Dni fermentacji						
	3	6	9	12	15	18	21
0,00	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0,14	0,21	0,14	0,22	0,13	0,09	0,07
0,15	0,13	0,20	0,14	0,18	0,09	0,05	0,04
0,20	0,28	0,35	0,17	0,23	0,17	0,10	0,08
0,30	0,25	0,29	0,21	0,30	0,14	0,12	0,13
0,40	0,40	0,45	0,35	0,35	0,22	0,16	0,12

ciorkowców do pałeczek ulega zmianie na korzyść tych ostatnich. Przy kwasowości 1% zdecydowaną przewagę zdobywają pałeczki i stanowią w następnej fazie fermentacji ponad 90% ogólnego stanu drobnoustrojów. Zwraca uwagę bardzo mała ilość drożdży — maksymalnie do kilku procent. Stosunek różnych grup drobnoustrojów (paciorkowce, pałeczki, drożdże) jest inny w tych samych dniach fermentacji w próbach kontrolnych i w próbach z dodatkiem cytrynianu sodu. Jest to prawdopodobnie połączone z procesem szybszego zakwaszania środowiska w obecności cytrynianu sodu.

3. ANALIZA KAPUSTY PO FERMENTACJI

W pierwszej serii doświadczeń, przeprowadzonych w zimie 1951/52, zwrócono główną uwagę na zawartość dwuacetylu, acetoiny i 2,3-butylenoglikolu. Wyniki analiz przedstawia tab. IV.

W drugiej serii doświadczeń przeprowadzonych w zimie 1952/53 zakres analiz znacznie rozszerzono oznaczając kwas cytrynowy, estry lotne, estry ogółem, aldehydy, acetale, kwas mlekowy, kwas askorbinowy, cukry, azot i suchą masę. Wyniki analiz przedstawiono w tab. V.

Jak widzimy, kiszonka praktycznie nie wykazuje zupełnie obecności dwuacetylu, acetoiny oraz bardzo małą zawartość 2,3-butylenoglikolu. Wartości te były te same zarówno w próbach kontrolnych, jak i z dodatkiem różnych ilości cytrynianu sodu. Nie można zauważyć również prawie żadnego wpływu cytrynianu na ilość pozostałych substancji lotnych, jak alkoholu, kwasów lotnych, estrów, acetali i aldehydów. Cytrynian sodu po ukończonej fermentacji znajduje się w tysięcznych częściach procentu. Widocznie jest on zużywany przez drobnoustroje, jako pożywka.

TABELA III

Zmiany mikroflory podczas przebiegu fermentacji (w %%)

Изменения состава микрофлоры во время течения ферментации (в %%)

The changes in the microflora composition during the fermentation process

Próba	Bez cytrynianu			0,1% cytrynianu sodu			0,2% cytrynianu sodu			0,3% cytrynianu sodu			0,4% cytrynianu sodu		
Rodzaj mikroflory	Paciorkowce	Pałeczki	Drożdże	Paciorkowce	Pałeczki	Drożdże	Paciorkowce	Pałeczki	Drożdże	Paciorkowce	Pałeczki	Drożdże	Paciorkowce	Pałeczki	Drożdże
dni fermentacji															
5	86.3	10.8	2,9	68.3	31.5	0,2	70.1	29,9	—	66,2	33,6	0,2	67.9	31,7	0.4
10	68.8	28.8	2,4	43.3	56.5	0 2	67.4	32,6	—	30,7	69.3	—	15.4	83.7	0,9
15	50.5	48.5	1.0	19.4	79.6	1.0	46.1	53.5	0,4	9.5	90.5	—	7,5	92,3	0,2
20	36 6	63,1	0.3	8,2	90.7	1.1	17,6	80.7	1,7	4,9	94,9	0.2	3.8	95,0	1,2
25	21 8	77.8	0.4	5,8	93,6	0.6	11.5	86.1	2,4	4.8	93.4	1.8	3.0	96.3	0.7
30	13.3	86.2	0.5	6.1	93,2	0,7	6,3	93,0	0.7	4.3	94,8	0,9	3.2	94.9	1,9

TABELA IV

Wyniki analizy kapusty po 30 dniach fermentacji

Результаты анализа квашеной капусты после тридцатидневной ферментации

Analysis of the cabbage-leaves after 30 days of the fermentation.

Dodatek cytryn. sodu %	Kwasowość ogólna w %/% kwasu mlek.	Kwasowość lotna w %/% kwasu oct.	Alkohol w %/% wag.	Dwuacetyl w mg %	Acetoina w mg %	2, 3-butylenoglikol w mg %
0,00	1,59	0,47	0,38	poniż. 0,01	poniż. 0,01	około 0,01
0,05	1,89	0,52	0,28	,, 0,01	,, 0,01	,, 0,01
0,15	1,75	0,50	0,38	,, 0,01	,, 0,01	,, 0,01
0,20	1,85	0,51	0,26	,, 0,01	,, 0,01	,, 0,01
0,30	1,75	0,50	0,22	,, 0,01	,, 0,01	,, 0,01
0,40	1,69	0,46	0,27	,, 0,01	,, 0,01	,, 0,01

Zawartość kwasu mlekowego wskazuje, że stanowi on prawie całą nielotną kwasowość kapusty.

Nie zauważono żadnej korelacji pomiędzy ilością dodanego cytrynianu a jakością smaku i zapachu gotowej konserwy.

Dwie serie doświadczeń nasunęły następujące przypuszczenia:

1. Acetoina i jej pochodne powstają podczas pierwszych stadiów fermentacji w czasie, kiedy przewagę mają bakterie fermentacji heteromlekowej typu *Betacoccus*. Związki te ulegają rozkładowi w czasie dofermentowania i dojrzewania kiszonki. W pierwszym stadium fermentacji również mogą wytwarzać acetoinę obecne tam bakterie z grupy *Aerogenes*, których uzdolnienia w tym kierunku są znane. W ostatnich stadiach fermentacji może zachodzić proces rozkładu acetoiny związany z wyczerpywaniem się łatwo dostępnych źródeł energii.

2. Kwas cytrynowy dodany przed rozpoczęciem fermentacji jest zużywany przez różne drobnoustroje zanim nastąpią sprzyjające warunki (odpowiednie pH i odpowiednia mikroflora) do wytwarzania acetoiny.

W celu wyjaśnienia tych zjawisk przeprowadzono jeszcze jedną serię doświadczeń. Kapustę z dodatkiem 0,15% cytrynianu sodu oraz próbę kontrolną poddano fermentacji w temperaturze pokojowej. Analizy przeprowadzano co sześć dni, określając kwasowość ogólną i lotną, alkohol, aldehydy, estry lotne, cukry ogółem, kwas askorbinowy, dwuacetyl, 2,3-butylenoglikol, acetoinę i kwas cytrynowy. Wyniki przedstawione są w tab. VI.

Wyniki tych analiz nie wykazują żadnych współzależności pomiędzy szybkością zużycia kwasu cytrynowego a powstawaniem acetoiny, dwuacetylu czy 2,3-butylenoglikolu oraz nie wykazują żadnej różnicy pomiędzy próbami z cytrynianem sodu a próbami kontrolnymi. Kapusta w szóstym dniu fermentacji wykazywała kwasowość około 1% w przeliczeniu na kwas mlekowy oraz zawartość kwasu cytrynowego w ilości około 0,1%, który zatem powinien wpłynąć na tworzenie acetoiny i dwuacetylu. We wszystkich próbach kapusta z dodatkiem cytrynianu

TABELA V

Analiza kapusty kiszonej po 30 dniach fermentacji

Результаты анализа квашеной капусты после 30 дней брожения

Analysis of the cabbage-leaves after 30 days of the fermentation.

Dodatek cytrynianu sodu %	Sucha masa w %	NaCl w %	Kwasowość: ogólna w g $CH_3CHOHCOOH$ na 100 ml	Kwasowość: lotna w g CH_3COOH na 100 ml	Alkohol w % wagow.	Azot w % wagow.	Aldehyd mg %	Acetale mg %	Estry lotne mg %	Estry ogółem mg %	Diwacetyl mg %	Aceton mg %	2, 3-butylenoglikol w mg %	Witamina C mg %	Cukry: Przed inwersją w %	Cukry: Po inwersji w %	Kwas cytrynowy w %	Kwas mlekowy w %
0,0	9,42	2,38	1,71	0,31	0,63	1,30	0,79	0,35	42,2	52,8	0,01	0,01	0,10	16,1	0,083	0,078		1,46
0,1	9,82	2,42	1,90	0,33	0,57	1,29	0,97	0,47	126,7	144,3	0,01	0,01	0,16	12,0	0,063	0,080	0,013	1,53
0,2	9,74	2,33	1,63	0,38	0,53	1,28	0,88	0,59	108,0	211,2	0,01	0,01	0,17	16,2	0,12	0,117	0,034	1,32
0,3	9,99	2,33	1,61	0,29	0,46	1,31	1,36	0,47	119,7	172,5	0,01	0,01	0,07	10,3	0,093	0,119	0,0013	1,23
0,4	9,81	2,36	1,70	0,35	0,57	1,31	1,60	0,71	77,4	119,7	0,01	0,01	0,10	9,6	0,18	0,185	0,036	1,31

TABELA VI

Zmiany zachodzące w kapuście w czasie fermentacji

Изменения выступающие в капусте во время ферментации

The content of the fermentation-products in the „sauerkraut" during the period of the fermentation

Dzień fermentacji	Dodatek cytryniany w %	Kwasowość		Alkohol w %/% wagow.	Aldehydy w mg %	Estry lotne w mg %	Cukry		Kwas askorbinowy w mg %	Dwuacetyl mg %	Acetoina mg %	2, 3-butylenoglikol mg %	Kwas cytrynowy %
		ogólna w g $CH_3CHOHCOOH$ na 100 ml	lotna w g CH_3COOH na 100 ml				bezpośrednia reduk. w %/%	po inwersji w %/%					
	0	—	—	—	—	—	3,24	3,66	16,1	—	—	—	0,15
	0	1,05	0.25	0,31	1,85	63,4	0,86	1 11	6,6	< 0,01	< 0,01	0,064	
6	0,15	1,19	0,27	0,43	2,42	38,7	0 59	0 64	6,8	< 0 01	< 0,01	0,140	0,105
	0	1,24	0,29	0,49	1,76	123,2	0,57	0,66	5,8	< 0,01	< 0,01	0,108	—
12	0,15	1,49	0,33	0,30	2,29	38,7	0,46	0,48	1,9	< 0,01	< 0,01	0,092	0,051
	0	1,24	0,32	0,30	0,97	77,4	0,40	0,43	5,9	< 0,01	< 0 01	0,103	—
18	0,15	1 35	0,33	0,26	1,01	63,4	0,42	0,43	6,8	< 0,01	< 0,01	0,106	0,051
	0	1,43	0 33	0,47	1,14	80,9	0,28	0,29	6,4	< 0,01	< 0,01	0,105	—
24	0,15	1,47	0,34	0,53	1,06	77,4	0 23	0,23	5,9	< 0.01	< 0,01	0,106	0,003

sodu wykazała wyższą kwasowość, co potwierdza wyniki uzyskane w poprzednich doświadczeniach.

Zmiany zawartości cukru wykazują, że są one rozkładane głównie w ciągu pierwszych dni fermentacji. W kiszonce z dodatkiem cytrynianu fermentacja cukru jest nieco szybsza, co jest zgodne z szybszym przyrostem kwasowości. Około 90% kwasowości lotnej tworzy się w ciągu pierwszych sześciu dni fermentacji. To samo można powiedzieć o alkoholu, który w większej ilości powstaje w pierwszych dniach kiszenia.

W celu zorientowania się co do zawartości acetoiny, dwuacetylu, 2,3-butylenoglikolu oraz innych substancji lotnych w kapuście rynkowej przebadano pięć prób kapusty w roku 1951/52 oraz cztery próby w roku 1952/53 nabyte w sklepach w Warszawie. Wyniki analiz wykazują, że kapusta rynkowa posiada na ogół dwuacetyl, acetoinę, 2,3-butylenoglikol, estry lotne i aldehydy w ilościach zbliżonych do kiszonki doświadczalnej. Zawartość alkoholu była na ogół wyższa a kwasowość ogólna niższa niż w kiszonkach doświadczalnych.

4. MIKROFLORA KAPUSTY KISZONEJ

Pod koniec drugiej serii doświadczeń przeprowadzono orientacyjne badania mikroflory kiszonej kapusty. Głównym celem tych badań było stwierdzenie, czy drobnoustroje fermentującej kapusty są zdolne do wytwarzania acetoiny z cukrów i cytrynianu sodu oraz uzyskanie pewnych orientacyjnych danych dotyczących charakteru mikroflory kiszonki doświadczalnej.

W tym celu wykonano oznaczenia:

a). Ogólnej ilości drobnoustrojów metodą płytkową na agarze z sokiem kapusty (F i o d o r o w, 1951). Ilość wyrosłych kolonii liczono po 3—4-ch dniach.

b). Reakcję Voges-Proskauera (R o s a n o w, 1952). 3-dniową kulturę wyrosłą na pożywce Clarka zadawano 10% roztworem KOH.

c). Próbę na fermentację samej glukozy oraz glukozy w obecności cytrynianu sodu przez drobnoustroje kwaszące kapustę wykonano na wzbogaconej glukozą pożywce Clarka. Pożywkę rozlano do butelek ze szkła oranżowego o pojemności 100 ml w ilości po 50 ml, szczepiono 24-o godzinną hodowlą odpowiednich drobnoustrojów. Codziennie badano przyrosty kwasowości oraz zawartość acetoiny i dwuacetylu, biorąc każdorazowo jedną butelkę z każdej serii.

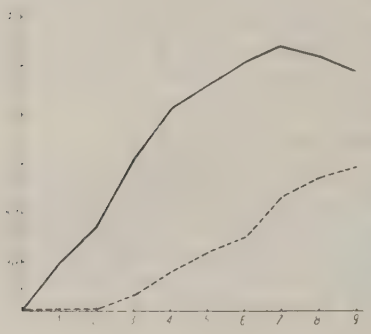
d). Próbę z kłutą żelatyną z sacharozą według O r l a - J e n s e n a (1942).

e). Próbę na katalazę — kilkudniową kolonię zadawano 1% roztworem H_2O_2 i obserwowano pod lupą wydzielanie się pęcherzyków gazu (R o s a n o w, 1952).

f). Barwienie metodą Grama.

Do powyższych badań użyto mikroflorę z kapusty kontrolnej bez cytrynianu sodu oraz z kapusty z dodatkiem 0,15% cytrynianu sodu. Ogólna ilość drobnoustrojów obliczonych metoda płytkową wynosiła dla kapusty bez cytrynianu 30 000 000 komórek w 1 ml, a w kapuście z dodatkiem cytrynianu 37 000 000. Większość wyrosłych kolonii miała formy

typowe dla bakterii kwasu mlekowego. Po 4-ch dniach dookoła kolonii utworzyły się strefy rozpuszczenia $CaCO_3$ dodanego do pożywki, o średnicy około 1,5 cm. Bakterii o słabej zdolności ukwaszania nie zaobserwowano. Wszystkie przebadane bakterie były pałeczkami nieruchliwymi, w 80% nie dającymi form łańcuszkowych. Z około 100 przebadanych bakterii wszystkie bakterie barwiły się gramdodatnio, nie wytwarzały katalazy. Obserwowane bakterie nie rozpuszczały żelatyny na płytkach po 7 dniach. Żelatynę z sacharozą po 10 dniach hodowli rozpuszczały w 40% wypadków. Reakcja Voges-Proskauera była dodatnia dla mikroflory mieszanej, wysiewanej bezpośrednio z kapusty. W 3-dniowych kulturach z kolonii na płytkach z agarem reakcja ta była ujemna.



Rys. 1. Wytwarzanie acetoiny z glukozy oraz z glukozy w obecności cytrynianu sodu przez bakterie powodujące fermentację kapusty.

Рис. 1. Образование ацетоина из глюкозы, а также из глюкозы в присутствии лимонокислого натрия, бактериями вызывающими ферментацию капусты.

Fig. 1. The production of acetoine in the glucose and the glucose — citrate — medium by bacteria isolated from the „sauerkraut".

Próbę na fermentowanie glukozy w obecności cytrynianu sodu dokonano z mikroflorą mieszaną pobraną bezpośrednio z kapusty kiszonej oraz z pałeczkami podobnymi do bakterii kwasu mlekowego. Wyniki przedstawia tab. VII i wykres I.

Wykres I wskazuje, że pałeczki wyizolowane z kapusty kiszonej mają zdolność wytwarzania acetoiny zarówno z glukozy w obecności cytrynianu sodu, jak i z samej glukozy. Na pożywkach bez cytrynianu sodu acetoina pojawia się w środowisku dopiero na 3 dzień fermentacji. Na pożywkach z dodatkiem cytrynianu sodu szybkość powstawania acetoiny, jak i bezwzględna ilość acetoiny i dwuacetylu, jest w każdym wypadku wyższa niż w próbach bez cytrynianu. Wskazuje to na wyraźny wpływ cytrynianu sodu na tworzenie acetoiny przez mikroflorę kapusty kiszonej.

Dane tab. VII wskazują, że w próbach z dodatkiem cytrynianu sodu przyrost kwasowości jest szybszy, co potwierdza wyniki poprzednich serii. Ilość acetoiny i dwuacetylu oraz przyrosty kwasowości są bardzo zbliżone zarówno w próbach z mikroflorą mieszaną kapusty, jak i z pałeczkami podobnymi do bakterii kwasu mlekowego, wyizolowanymi z fermentującej kiszonki.

IV. DYSKUSJA

Doświadczenia powyższe wykazały, że dodatek cytrynianu sodu nie wpływa na wytwarzanie się dwuacetylu, acetoiny i 2,3-butylenoglikolu w kapuście kiszonej, mimo, że bakterie wyodrębnione z kapusty kiszonej są zdolne do tworzenia acetoiny na pożywkach laboratoryjnych nawet w nieobecności cytrynianu sodu. Drobnoustroje hodowane na pożyw-

TABELA VII

Przyrosty kwasowości na wzbogaconej pożywce Clarka fermentowanej przez drobnoustroje kiszonej kapusty

Повышение кислотности на среде Кларка с добавлением питательных веществ под влиянием микроорганизмов выступающих в квашеной капусте

The increase in the acidity of the enriched Clark medium after the incubation in it of microorganisms isolated from „sauerkraut"

Rodzaj mikroflory	Pożywka	Kwasowość po dniach									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pałeczki kwasu mlekowego z kapusty	Glukoza	0,27	0,31	0,33	0,38	0,46	0,50	0,49	0,49	0,50	—
	Glukoza + 0,1% cytryn. sodu	0,33	0,41	0,46	0,49	0,61	0,60	0,63	0,66	0,63	—
Mikroflora mieszana kapusty	Glukoza	0,22	0,30	0,37	0,41	0,44	0,47	0,53	0,58	0,62	0,68
	Glukoza + 0,1% cytryn. sodu	0,34	0,43	0,56	0,61	0,68	0,77	0,85	0,90	0,94	0,95

kach laboratoryjnych w obecności cytrynianu sodu wytwarzają acetoinę szybciej i w większej ilości, niż w próbach kontrolnych bez cytrynianu. Kwas cytrynowy dodany na początku jest obecny w fermentującej kiszonce w drobnych ilościach prawie do końca fermentacji.

Zjawisko braku acetoiny i jej pochodnych w kapuście, zgodnie z wynikami tych doświadczeń, wydaje się niezrozumiałe. Przypuszczać można, iż działają tutaj następujące przyczyny:

a). Acetoina i jej pochodne są wytwarzane przez drobnoustroje żyjące w fermentującej kapuście, jednak związki te są zużywane przez inne drobnoustroje.

b). Bakterie fermentujące kapustę posiadają odpowiedni system enzymatyczny, który jednak jest hamowany przez nieznane nam czynniki.

c). Wytworzony dwuacetyl i acetoina łączą się z innymi związkami, względnie między sobą, na połączenia nie dające reakcji charakterystycznych dla tych związków.

Zdolność do zużywania acetoiny i jej pochodnych posiadają liczne drobnoustroje. Donoszą o tym Virtanen i Kontio 1940 b), Wiley, Cox i Whitehead wg Mattick, Hiscox i Davies (1940), Brioux i Jouis (1938), Kobahidze (1950), Orłowa (1950) i inni. Täufel i Krusen (1952) donoszą o zanikaniu acetoiny w środowisku kwaśnego mleka, nie podają jednak przyczyn tego zjawiska. Wspomniane wypadki zużywania w procesach metabolicznych przez drobnoustroje dwuacetylu, acetoiny i 2,3-butylenoglikolu być może są częstsze w środowiskach zawierających mało innych dostępnych źródeł węgla. Można jednak przypusz-

czać, że może to być przyczyną braku acetoiny również i w kiszonej kapuście.

Drugim powodem braku tych związków w kapuście może być działanie inhibicyjne środowiska na systemy enzymatyczne drobnoustrojów wytwarzających acetoinę. Literatura dostarcza licznych przykładów hamowania wytwarzania acetoiny i dwuacetylu przez pewne związki. Np. Rowatt (1951) donosi, że produkcja acetoiny u *Lactobacillus plantarum* hamuje obecność niektórych ogniw kwasów trójkarboksylowych. Silverman i Werkman (wg Mattick, Hiscox i Davies 1940) oraz Abbot (1940) donoszą o wpływie na ten proces pewnych jonów, kokarboksylazy oraz innych nieznanych czynników.

Nie można również wykluczyć trzeciej ewentualności, to jest przekształcania w inne związki acetoiny i dwuacetylu w fermentującej kapuście ze względu na ich stosunkowo wysoką reaktywność.

Stwierdzono wyraźny wpływ cytrynianu sodu na zmniejszenie ubytków wagowych oraz przyspieszanie przyrostów kwasowości. Niższe ubytki wagowe pozostają prawdopodobnie w związku z szybszym zakwaszaniem środowiska a tym samym z szybszym hamowaniem procesów respiracyjnych tkanek roślinnych. Nie jasna jest rola cytrynianu sodu w procesie przyśpieszania tworzenia kwasów w fermentującej kapuście. Cytrynian sodu, stosowany jako dodatek w opisanych doświadczeniach, posiadał pH około 8,0. Obecność jego powodowała zatem przesunięcie równowagi jonowej w kierunku alkalicznym. Zdolność do rozkładu kwasu cytrynowego posiadają liczne drobnoustroje. Literatura z tego zakresu jest stosunkowo obszerna. Brewer i Werkman (wg Portera 1940) studiowali przemiany kwasu cytrynowego u *Aerobacter indologenes*. Beynum i Pette (1939) badali zdolność rozkładu kwasu cytrynowego u betabakterii kwasu mlekowego. Campbell i Gunsalus (1943) donoszą o zdolności do rozkładu kwasu cytrynowego przez homofermentatywne bakterie kwasu mlekowego z rodzaju *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Szczegółowo badał ten proces Deffner (wg Stephenson 1951) u grupy *Enterobacteriaceae*, głównie *Aerogenes*. Ze wszystkich schematów wynika, że kwas cytrynowy jest rozkładany na kwasy o mniejszej cząsteczce takie, jak octowy, mrówkowy, bursztynowy. Z żadnego schematu nie wynika jednak silniejsze zakwaszenie środowiska niż daje kwas cytrynowy. Pozostaje do przyjęcia możliwość, że cytrynian sodu wpływa w jakiś sposób na system enzymatyczny drobnoustrojów pobudzając go do zwiększenia szybkości zakwaszania środowiska. Dotychczas w literaturze brak danych dotyczących dodatniego wpływu kwasu cytrynowego lub cytrynianów na przyspieszenie wytwarzania kwasów przez drobnoustroje. Davies (1939) w swojej pracy nad wpływem różnych czynników odżywczych na bakterie kwasu mlekowego nie stwierdził takiego wpływu cytrynianów. Tempelton i Sommer (1935) stwierdzili tylko, że dodatek 0,2% kwasu cytrynowego lub cytrynianu sodu do zakwasu maślarskiego powoduje podniesienie kwasowości lotnej o 50% a kwasowości ogólnej o 10%. Brak jednak danych dotyczących przebiegu ukwaszania.

W ostatnich latach publikowane są wyniki badań nad cyklem kwasów trójkarboksylowych u drobnoustrojów, przy czym niektórzy autorzy, jak np. Dagley, Daves, Morrison (1950) wskazują na rolę niektórych członów tego cyklu w procesie pobudzania drobnoustrojów do wzrostu w pierwszych stadiach ich rozwoju. Kwas cytrynowy, jako jeden z członów cyklu Krebsa, być może, pełni taką rolę u drobnoustrojów fermentujących kapustę. Przebieg fermentacji wskazuje, że ewentualne pobudzenie prowadzi do wzmożonego zakwaszenia środowiska. Skrócenie procesu zafermentowania kiszonek ma bardzo ważne znaczenie praktyczne. Szybkie zakwaszenie powoduje, między innymi, lepsze zachowanie kwasu askorbinowego i cukrów co jest jednym z podstawowych zagadnień w kiszeniu kapusty.

Niejasne są przyczyny braku wpływu cytrynianu na kwasowość końcową. Być może, że część cukrów jest rozkładana do produktów niezakwaszających środowiska, nie objętych przeprowadzoną analizą (mannit, gliceryna i inne). Wynika to z wyższej zawartości suchej masy w kapuście z cytrynianem w porównaniu z próbami kontrolnymi.

V. WNIOSKI

1. Obecność cytrynianu sodu w kapuście poddanej fermentacji nie wpływa na zwiększenie w niej zawartości dwuacetylu, acetoiny i 2,3-butylenoglikolu.
2. Dodatek cytrynianu sodu wyraźnie przyspiesza tempo tworzenia się kwasów oraz zmniejsza ubytki wagowe kiszonki.
3. Zawartość acetoiny i jej pochodnych w kapuście kiszonej, fermentowanej zarówno w obecności cytrynianu jak i bez cytrynianu, pozostaje na bardzo niskim poziomie. Dwuacetyl i acetoinę znajdowano zwykle w śladach a 2,3-butylenoglikol w ilościach od kilku do kilkunastu mg%.
4. Acetoina i jej pochodne nie biorą więc udziału w tworzeniu aromatu kapusty kiszonej.
5. Cytrynian sodu wpływa tylko w nieznacznym stopniu na wytwarzanie w kapuście kiszonej związków lotnych jak alkoholu, kwasów lotnych, aldehydów, acetali i estrów.
6. Obecność cytrynianu sodu w fermentującej kapuście nie wpływa na wartości smakowe i zapachowe kapusty ukiszonej.
7. Drobnoustroje fermentujące kapustę mają zdolność do tworzenia acetoiny na pożywkach sztucznych zarówno w obecności cytrynianu jak i bez cytrynianu.

A. Горубала

ЛИМОННАЯ КИСЛОТА КАК МОДИФИЦИРУЮЩИЙ ФАКТОР БРОЖЕНИЯ КАПУСТЫ

Резюме

Целью настоящей работы является исследование воздействия лимонной кислоты на образование ароматических соединений. двуацетила и ацетоина в квашеной капусте. На основании проведенного опыта установлено, что не существует

никакого воздействия лимонной кислоты на образование выше указанных соединений в квашеной капусте.

Однако выделенные из квашеной капусты микроорганизмы продуцировали большое количество ацетоина и двуацетила на исскуственных питательных средах как при наличии, так и в случае отсутствии лимонной кислоты.

Прибавление лимонной кислоты к питательным средам стимулировало процесс образования ацетоина и двуацетила, а также оказывало влияние на количество этих соединений в последней фазе брожения.

Заметное воздействие лимонной кислоты наблюдается в процессе ускорения образования кислот в броженной капусте в первоначальный период закисания. Результатом этого является уменьшение весовых потерь, следовательно в определенных условиях может иметь практическое значение для производства квашеной капусты.

В работе обсуждаются вероятные причины отсутствия двуацетила в квашеной капусте, а также влияние лимонной кислоты на процесс побуждения микроорганизмов к ускорению образования кислот в первые дни брожения

A. Horubała

CITRIC ACID AS A FACTOR MODYFYING THE SAUERKRAUT FERMENTATION

Summary

The primary aim of the work was the study of influence of citrates (0,5 — 0,4% as sodium salt) on the formation of diacetyl and acetyl-methyl-carbinol in sauerkraut during fermentation.

In three series of laboraty experiments with small batches of sauerkraut it was found that the addition of sodium citrate was without effect, the samples of final sauerkraut being practically devoid of either diacetyl or acetyl-methyl-carbinol (below 0,01 mg%) although the chief types of lactic bacteria isolated from these samples were able te produce considerable amounts of diacetyl and acetoin in the media containing citrates.

Addition of citrate had, however, a stimulating action upon the rate of fermentation (especially during the first days) and also caused a decrease of gaseous losses during the fermentation. The apparent lack of influence of the citrate on the diacetyl and acetoin formation in the sauerkraut and the stimulating effect of citrate on the rate of lactic acid fermentation is discussed in conjunction with the present theories on the citric acid metabolism.

LITERATURA

1. A b b o t W. C., 1940/41: Effects of Tomato Juice on Productions of Flaver Contributans in Butter Culture, *Dairy Sci. Abstr.*, **2** : 4.
2. B a b a d J. a. S t r i k m a n n N., 1951: The Estimation of Citric Acid in Dairy Products. *J. Dairy Res.*, **18** : 72.
3. B e y n u m J. a. P e t t e J. W., 1939: The Decomposition of Citric Acid by *Betacoccus cremoris.*, *J. Dairy Res.*, **10** : 250.
4. B r i o u x Ch., J o u i s E., 1938: Diacetyl in der Normandischen Butter. *Z. f. Untersuch. Lebensm.*, **76** : 184.

5. Campbell J. J. R., Gunsalus J. C., 1943/44: Fermentation of Citric Acid by Homofermentative Lactic Acid Bacteria., *Dairy Sci. Abstr.*, **5** : 1.
6. Cerewitinow W. F., 1949: Chimija i towarowiedienie swieżych płodow i owoszczej., t. I. Moskwa.
7. Dagley S., Daves E. V., Morrison H. A., 1950: Factors Influencing the early phases of growth of *Aerobacter aerogenes., J. Gen. Microb.*, **4** : 437.
8. Davies J. G., 1939: The Nutritional Requirements of the Lactic Acid Bacteria., *J. Dairy Res.* **10** : 186.
9. Fiodorow M. W., 1951: Rukowodztwo k prakticzeskim zaniatiam po mikrobiołogij. Moskwa.
10. Frołow-Bagrejew A. M., 1951: Chimija wina, Moskwa.
11. Kniphorst L. G., Kruischer J. C., 1937: Die Bestimmung 2-3-butylenglikol, Acetylmetylcarbinol und Diacetyl in Wein und anderen Gärungsprodukten., *Z. f. Untersuch. Lebensm.*, **73** : 1.
12. Kobachidze M. G., 1950: Genezis metylacetylcarbinola pri uskusnokisłym brożenij., *Biochimia winodielja.* 3 : 138.
13. Matuszewski T., Pijanowski E. i Supińska J., 1936: *Streptococcus diacetilactis n. sp.* i jego zastosowanie przy wyrobie masła. Prace i sprawozdania Inst. Fermen. i Zakł. Mikr. i Techn. Przem. Roln. SGGW Warszawa.
14. Mattick A. T. R., Hiscox E. R. a. Davis J. S., 1940/41: Biennial Review of the Progres of Dairy Science., *J. Dairy Res.*, **11—12**: 358.
15. Meszkowa N. P. i Sewerin C. E., 1950: Praktikum po biochimii żiwotnych. Moskwa.
16. Michaelian B. H., Hammer B. W., 1938: Untersuchung über Acetoin und Diacetyl in Milchprodukte., *Z. f. Unteruch. Lebensm.*, **76**: 81.
17. Michaelian M. B., Hoecker W. N., Hammer B. W., 1938: Effect of pH on the production of acetylmetylcarbinol plus diacetyl in Milk by the Citric Acid Fermenting Streptococci., *Iowa State College Ames*, Iowa.
18. Orla-Jensen S., 1942: The Lactic Acid Bacteria. Kopenhaga.
19. Orłowa H. W., 1950: Obrazowanija acetoina i 2,3-butylenoglikola kulturoj *Aerobacter aerogenes, Mikrobiołogia* **19**: 326.
20. Pederson C. S., 1930: Floral Changes in the Fermentation of Sauerkraut., N. Y. State Expt. Sta. Tech. Bull., 168.
21. Pijanowski E., 1951: Zarys technologii produktów owocowych i warzywnych, t. I. Warszawa.
22. Porter J. R., 1947: Bacterial Chemistry and Physiology., N. Y. — London.
23. Prill E., A., Hammer B. W., 1939: Production of diacetyl from Citric Acid in Butter Cultures., *J. Dairy Sci.*, **22** : 67.
24. Rosanow N. J., 1952: Mikrobiołogiczeskaja diagnostika zobolewania sielskochozjastwiennych żiwotnych. Moskwa.
25. Rowatt E., 1951 The Metabolism of Pyruvate by *Lactobacillus plantarum., Biochem. J.*, **49** : 453.
26. Schmalfuss H., Barthmayer H. 1929: Diacetyl als Aromabestandteil von Lebens und Genussmittel., *Biochem. Ztsch.* **16**: 330.
27. Skorodumowa A. M., 1949: Prakticzeskoje rukowodztwo po techniczeskoj mikrobiołogi mołoka i mołocznych produktow., Moskwa.
28. Stephenson M., 1951 (tłum. ros.): Metabolism bakterii, Moskwa ANSSSR.

29. Täufel K., Krusen F., 1952: Der Abbau der Citronsäure durch Milchsäurebakterien., *Biochem. Ztsch.*, **322** : 371.
30. Tempelton H. L., Sommer H. H., 1935: Use Citric Acid and Sodium Citrate for Buttermaking., *J. Dairy Sci.*, **18** : 97.
31. Van Niel C. B., Kluyver A. J., Derx H. G., 1929: Uber das Butteraroma. *Biochem. Ztsch.*, **210** : 234.
32. Virtanen A. J., 1934: 5 Years experience of A. I. V. Fodder. Helsinki.
33. Virtanen A. J., Kontio P., Storgärds T., 1940/41: Die Aromabildung bei der Rahmsauerung., *Biochem. Ztsch.*, **307** : 215.
34. Virtanen A. J., Kontio P., 1940/41: Disappearance of Acetylmetylcarbinol and Diacetyl Caused by Microorganisms., *Dairy Sci. Abstr.*, **2**: 1.
35. Zbiorowe, 1949: Kalendarz Techniczny Przemysłu Spożywczego, t. I.

A. Jankun

BADANIA NAD SZCZEPEM DROŻDŻY „PORZECZKA 1" WYIZOLOWANYM Z MIKROFLORY WYSTĘPUJĄCEJ NA PORZECZCE CZERWONEJ *)

Z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego w Krakowie.

Wpłynęło dnia 15.V.1954 r.

WSTĘP

Przystępując do wyprowadzenia czystych kultur drożdży z mikroflory występującej na porzeczce czerwonej nie spodziewałem się osiągnąć przy zastosowaniu ich dużych różnic w porównaniu z drożdżami ras winiarskich przy zapoczątkowaniu i przebiegu fermentacji. Powodem do takiego przypuszczenia było to, że porzeczka nie zawiera, jak wiadomo, składników wpływających hamująco na czynności życiowe drożdży. Dlatego też drożdże na niej występujące nie muszą mieć specjalnych cech przystosowawczych jak to ma miejsce na przykład na borówce czernicy, czy brusznicy.

Oczekiwać by należało od nich raczej ujawnienia w winie charakterystycznych właściwości zapachowo-smakowych dla tego surowca.

W latach 1945—1947 F l e r o w i K o w a l e n k o (1949) badali, między innymi, drożdże występujące na czerwonej i czarnej porzeczce oraz ich przydatność dla winiarstwa. Badacze ci spotkali powodujące fermentację drożdże na pędach, kwiatach, dojrzałych jagodach i w glebie pod krzakami porzeczki czerwonej.

Na tablicy, zawierającej charakterystykę najbardziej interesujących dla przemysłu ras, nie zamieścili autorzy drożdży występujących na porzeczce czerwonej. Natomiast przy zastosowaniu rasy „Czarna porzeczka II" otrzymali wino o zawartości 13,9% objętościowych alkoholu, a „Czarna porzeczka VIII" — 14.0% objętościowych alkoholu.

S z e m b e r (1951) zaliczył drożdże wyosobnione przez siebie z porzeczki czerwonej do grupy słabiej fermentującej sacharozę: 51 — 75 %.

*) Jest to drugi fragment opracowywanego tematu pt. „Poszukiwanie nowych ras drożdży przystosowanych do poszczególnych owoców oraz gatunków win". Pierwszym fragmentem było wyprowadzenie czystych kultur z mikroflory drożdżowej występującej na borówce czernicy (*Vaccinium myrtillus L.*). Najlepsze z wyosobnionych szczepów, drożdże „Borówka 3" są już stosowane w przemyśle.

Dawał on 5 g sacharozy na 50 ml pożywki. Fermentacja trwała 10 dni w temperaturze 28°.

W tych samych warunkach drożdże wyosobnione z innych owoców jak na przykład porzeczka czarna, agrest, jeżyna — fermentowały sacharozę w granicach 76 — 98%.

METODY BADAŃ

Próbki czerwonych porzeczek (*Ribes rubrum L.*) pobrano w Krakowie na Woli Justowskiej i w Zakładzie Ogrodnictwa U. J., oraz w Puławach w ogrodzie I. U. N. G. z odmian holenderskiej, wersalskiej i wiśniowej.

Próbki pobrano w okresie trwającej od dłuższego czasu słonecznej pogody i z krzaków jak najbardziej oddalonych od drogi. Jagody zebrano wyjałowionymi pensetami do wyjałowionych naczyń.

Mikroflorę uzyskaną w wyniku samofermentacji przeszczepiono parę razy na wyjałowiony moszcz porzeczkowy.

1. WYOSOBNIENIE CZYSTYCH KULTUR I ICH CECHY MORFOLOGICZNE

Wyosobnienie czystych kultur drożdży poprzedzono obserwacją mikroskopową płynnej hodowli. Izolację zaczęto od zastosowania metody rozcieńczeń Kocha (J ö r g e n s e n 1940). Na płytki zaszczepiono po 1 ml osadu mikroflory w rozcieńczeniu: 1 : 100; 1 : 1000; 1 : 10000 i 1 : 100000.

Wyhodowane na agarze (2%) z brzeczką pojedyncze kolonie drożdży o budowie morfologicznej podobnej do budowy kolonii drożdży winiarskich (J a n k u n 1953) przeszczepiono na pożywkę płynną celem dokonania obserwacji mikroskopowych. Następnie wyhodowano w odpowiedniej ilości zawiesinę drożdżową i zrobiono nastaw porównawczy.

Dopiero ze szczepu, który w pierwszym próbnym nastawie dał najlepsze odfermentowanie, wyprowadzono czyste kultury drożdży metodą kropelkową Lindnera (L i n d n e r 1930, M a t u s z e w s k i 1947). Metoda ta daje od poprzedniej większą gwarancję, że wyosobniona kultura pochodzi faktycznie z jednej komórki. Zawdzięczamy to również i temu, że kolonia, powstająca w kropli brzeczki z jednej komórki ma inną morfologię niż kolonia wytworzona przez dwie lub więcej komórek.

Wyhodowane kolonie drożdży w kroplach wiszących przeszczepiano do probówek zawierających po 5 ml brzeczki słodowej. Drożdże z probówek przeszczepiano do kolbek, zawierających po 50 ml moszczu porzeczkowego.

Czystą kulturę, która dała w drugim próbnym nastawie najlepsze odfermentowanie poddano dalszemu badaniu.

Pomiary komórek tego szczepu zrobiono po 24-godzinnej hodowli na brzeczce słodowej. Taką samą 24-godzinną kulturę z brzeczki przeniesiono na bloczki gipsowe celem sprawdzenia zdolności zarodnikowania.

Obserwacje morfologiczne i pomiary poczyniono na żywym materiale. Wszystkie hodowle prowadzono w cieplarce w temperaturze 25°.

Fotografie wykonano przy pomocy mikroskopu „Mikrophot".

2. FERMENTACJA SACHAROZY

W soku przeznaczonym do prób nad zdolnością fermentowania sacharozy przez wyosobnione drożdże, oznaczano kwasowość ogólną, alkohol, zawartość kwasów lotnych, ciężar właściwy, ekstrakt, cukry oraz ekstrakt bezcukrowy. Oznaczenia te powtarzano po doprawieniu soku. Takie same oznaczenia wykonano po pierwszym obciągu wina i po trzymiesięcznym „leżakowaniu":

1. Kwasowość ogólną oznaczano miareczkując 0,1 n NaOH. Jako wskaźnika używano papierka lakmusowego. Wyniki wyrażano w gramach na litr w przeliczeniu na kwas winowy (K r a u z e 1948) - - średnia z dwóch oznaczeń.

2. Kwasy lotne oznaczano przez destylację z parą wodną i odmiareczkowanie destylatu 0,1 n ługiem wobec fenolftaleiny. Zawartość kwasów lotnych wyrażano w gramach na litr w przeliczeniu na kwas octowy.

3. Alkohol oznaczano przez destylację zobojętnionej próbki i oznaczenie ciężaru właściwego destylatu alkoholowo-wodnego przy 15° 15° przy pomocy piknometru. Zawartość alkoholu odczytywano z tablic Windischa (średnia z dwóch oznaczeń).

4. Ciężar właściwy oznaczano piknometrycznie (średnia z dwóch oznaczeń). Ciężar właściwy wina bez alkoholu obliczano stosując wzór Tabariego.

5. Ekstrakt oznaczano pośrednio. Mając ciężar właściwy wina odczytywano zawartość ekstraktu, zależnie od ilości, z tablic Ackermanna lub Plato.

6. Cukry oznaczano metodą wagową Allihna.

7. Ekstrakt bezcukrowy oznaczano pośrednio odejmując cukry od ekstraktu ogólnego.

Moszcze sterylizowano w autoklawie przy nadciśnieniu jednej atmosfery, kolby zawierające płyn do 250 ml — przez 20 minut, przy większej ilości płynu — 30 minut. Jeżeli do nastawu używany był surowy moszcz, to dodawano do niego pirosiarczyn potasowy.

Do nastawów używano kolbek płaskodennych o pojemności około 0,5 litra, zawierających 285 ml moszczu — 15 ml zawiesiny drożdżowej. Zamykano je korkami zaopatrzonymi w rurki fermentacyjne z kwasem siarkowym rozcieńczonym wodą w stosunku 1 : 1. Rurki fermentacyjne połączono przy pomocy węża gumowego z rurkami z chlorkiem wapnia w celu zapobiegnięcia pochłaniania wody z zewnątrz.

Wszystkie próby na zdolność fermentacyjną drożdży przeprowadzono w temperaturze 25°.

Degustację wina (F r o ł o w - B a g r i e j e w i A g a b a l i a n c 1951, G i e r a s i m o w 1952, T i l g n e r 1952) przeprowadzono według metody stosowanej wówczas w polskim przemyśle owocowo-warzywnym. Wyniki degustacji wina oceniano na podstawie 100 punktowej klasyfikacji.

Poszczególne cechy oceniono następująco:

Cecha	Zła	Niewyst.	Wystarcz.	Dobra	B. dobra
Klarowność	1 pkt.	2 pkt.	3 pkt.	4 pkt.	5 pkt.
Barwa	1 „	2 „	3 „	4 „	5 „
Aromat	6 „	12 „	15 „	24 „	30 „
Smak	10 „	20 „	30 „	40 „	50 „
Typ	2 „	4 „	6 „	8 „	10 „
Suma	20 pkt.	40 pkt.	60 pkt.	80 pkt.	100 pkt.

Aby dostosować wyizolowane drożdże do środowiska o większej zawartości cukrów, niż było ich w jagodach porzeczki, prowadzono hodowlę na moszczach o wzrastającej zawartości cukru.

3. FERMENTACJA CUKRÓW DIAGNOSTYCZNYCH

Próby fermentowania cukrów diagnostycznych przeprowadzono na półsyntetycznej pożywce z glukozą, fruktozą, mannozą, galaktozą, sacharozą, maltozą, laktozą i rafinozą.

Nastawy próbne w probówkach zaszczepionych drożdżami „Porzeczka 1" umieszczono w cieplarce o temperaturze 25°. Zdolność fermentowania cukrów przez drożdże określano na podstawie wydzielania przez nie CO_2.

4. PRÓBA NA SKALĘ TECHNICZNĄ

Na podstawie przeprowadzonych badań laboratoryjnych opracowano instrukcję dotyczącą sposobu doprawiania moszczu, postępowania z drożdżami i prowadzenia nastawów. Zgodnie z zaleceniem instrukcji notowano w wytwórni win spostrzeżenia związane z przebiegiem fermentacji, klarowania i dojrzewania wina.

Pierwszą próbę przeprowadzono w wytwórni win w Krakowie, drugą — w Lanckorońskiej Wytwórni Win w Kalwarii.

WYNIKI BADAŃ

1. WYOSOBNIENIE CZYSTYCH KULTUR I ICH CECHY MORFOLOGICZNE

W 5-ciu próbkach pobranych na Woli Justowskiej środowisko opanowały mikroorganizmy o budowie morfologicznej podobnej do rodzaju *Saccharomyces*.

Na pięć próbek pobranych w Zakładzie Ogrodnictwa U. J. w dwóch znaleziono mikroorganizmy podobne do rodzaju *Saccharomyces*, w trzech pozostałych rozwinęły się inne drobnoustroje.

*) W obecnie stosowanym systemie w naszym przemyśle owocowo-warzywnym na 100 punktów składa się suma oceny elementów produkcji technicznej i elementów próby degustacyjnej.

Wyraźne objawy fermentacji stwierdzono w próbkach pobranych z porzeczki czerwonej wersalskiej i holenderskiej w Puławach. Natomiast w próbce z porzeczki wiśniowej fermentacja była bardzo słaba. Zawiesina przeszczepiona na brzeczkę i na moszcz porzeczkowy dała ten sam wynik. Wobec tego wyhodowaną mikroflorę z porzeczki wiśniowej wyeliminowano z dalszych prób.

Przy obserwacji mikroskopowej osadu z płynu i materiału z kolonii uzyskanych na pożywce stałej, stwierdzono:

1. W próbkach z porzeczki wersalskiej obecność różnych drobnoustrojów zarówno o budowie podobnej do budowy komórek rodzaju *Saccharomyces* jak i innej.

2. W próbkach z porzeczki holenderskiej obecność drobnoustrojów o budowie morfologicznej innej niż komórek rodzaju *Saccharomyces*.

3. W próbkach z porzeczki wiśniowej nie spotykano drożdżaków podobnych do *Saccharomyces*.

Kolonie, w których stwierdzono obecność drożdżaków podobnych do rodzaju *Saccharomyces*, były prawie okrągłe, lekko wypukłe, gładkie, miejscami nieznacznie sfalowane, białe, lśniące, jakby wilgotne. Były one podobne do kolonii drożdży winiarskich. Pojedyncze kolonie z próbek wziętych z Woli Justowskiej, wyhodowane z największych rozcieńczeń, miały wymiary (po upływie 10 dni) od 4 × 5 mm do 10 × 10 mm.

Kolonie otrzymane w tych samych warunkach z próbek zebranych w Zakładzie Ogrodnictwa U. J. różniły się od poprzednich mniejszymi wymiarami (4 × 4 mm do 5 × 5 mm).

Tego samego typu kolonie drożdży wyizolowano z porzeczki wersalskiej. Były one jednak mniejsze od poprzednich (od 2 × 2 mm do 4 × 4 mm), przy czym rozwijały się na powierzchni i wewnątrz pożywki.

Zupełnie inny wygląd miały kolonie uzyskane z próbki porzeczki odmiany holenderskiej, wersalskiej i z pozostałych próbek z Zakładu Ogrodnictwa U. J. Były one płaskie, o karbowanych zarysach, o odcieniu popielatym, bez połysku, raczej „suche", matowe. Rozwijały się tylko na powierzchni pożywki. Wymiary ich wykazały znaczne wahania: od 3 × 3 mm do 12 × 17 mm.

Pierwszy nastaw porównawczy zrobiono z drożdżami wyosobnionymi metodą płytkową. Przeprowadzono kontrolę wagową przebiegu fermentacji w pierwszym próbnym nastawie i oznaczono zawartość alkoholu w wyprodukowanym winie. Na tej podstawie stwierdzono, że z 16-tu wyosobnionych metodą płytkową szczepów drożdży najwyższe odfermentowanie dał szczep oznaczony jako drożdże „Justowskie 5".

Z tego szczepu wyosobniono 5 czystych kultur metodą kropelkową. Na podstawie drugiego próbnego nastawu stwierdzono, że najlepsze odfermentowanie dała czysta kultura oznaczona jako „Porzeczka 1". Kulturę tę poddano dalszemu badaniu.

Zmierzono 100 komórek drożdżowych szczepu „Porzeczka 1". Wyniki pomiarów są następujące:

Długość w μ				Szerokość w μ			
min. maks.	najczęściej spotykana (Mo)	średnia (M)	średnia odchyleń (σ)	min. maks.	najczęściej spotykana (Mo)	średnia (M)	średnia odchyleń (σ)
4,8—9,7	7,4	7,2	0,94	3,6—6,9	4,8	5,2	0,65

Komórki miały na ogół kształt owalny, czasem jednak zdarzały się kuliste. Drożdże „Porzeczka 1" rozmnażały się przez pączkowanie, tworząc jeden pączek (Fot. 1).

Drożdże te wysiane na wilgotny bloczek gipsowy wytworzyły worki z zarodnikami po upływie 68 godzin (Fot. 2). Zarodniki w ilości od 1 do 4 były ułożone niekiedy w jednej linii.

Spotykano też worki, w których jednym końcu znajdowały się dwa mniejsze, a w drugim jeden większy zarodnik. Przy obserwacji mikroskopowej stwierdzono, że zarodnikowało ca 50% komórek.

Zmierzono średnicę 100 zarodników wytworzonych przez drożdże „Porzeczka 1". Otrzymano następujące wyniki:

Średnica w μ			
min. maks.	najczęściej spotykana (Mo)	średnia (M)	średnia odchyleń (σ)
2,7—4,6	3,9 i 4,2	3,9	0,48

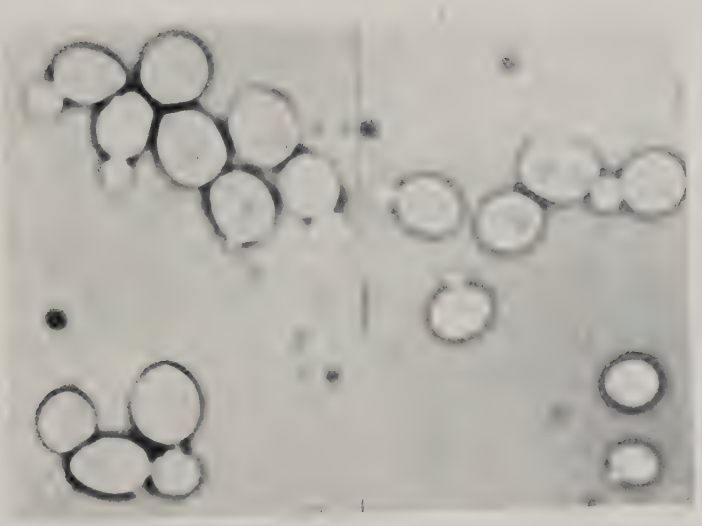
Skrócenia okresu wytwarzania zarodników nie udało się osiągnąć ani przez stosowanie zmienianej wilgotności bloczka gipsowego, różnego przewietrzania hodowli, ani przez zwiększanie lub zmniejszanie ilości drożdży wysiewanych na bloczek.

W pożywkach płynnych po zakończonej fermentacji drożdże opadały na dno. Znajdujący się nad nimi płyn był całkowicie klarowny.

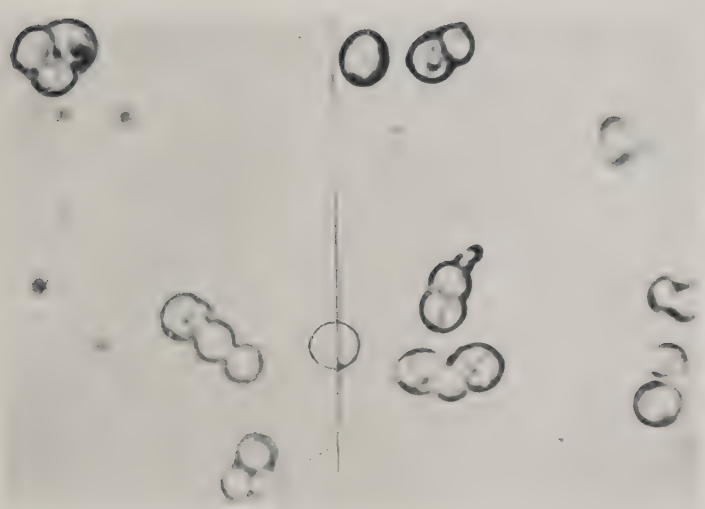
2. FERMENTACJA SACHAROZY

Nastaw I zrobiono w styczniu 1952 r. Moszcz porzeczkowy, po sterylizacji miał następujące cechy fizyko-chemiczne:

ciężar właściwy (przy $15^0/15^0$)	1,0974	
kwasowość ogólna (oblicz. jako kwas winowy)	8,0	g/litr
kwasowość lotna (jako kwas octowy)	0,46	g/litr
alkohol	0	
ekstrakt	253,7	g/litr
cukry (oblicz. jako cukier inwert.)	236,8	g/litr
ekstrakt bezcukrowy	16,9	g/litr



Fot. 1. Pączkujące drożdże „Porzeczka 1"
Фот. 1. Почкующие дрожжи „Смородина 1"
Fig. 1. — Budding yeast „Porzeczka 1"



Fot. 2. Worki z zarodnikami, wytworzone przez drożdże „Porzeczka 1". pow. 1000 x

Фот. 2. Сумки со спорами, образованные дрожжами „Смородина 1". Fig. 2. — Asci with ascospores, the yeast „Porzeczka 1", 1000 x

Do moszczu dodano dwuzasadowego fosforanu amonowego w ilości 0,3 g/litr.

Nazwy szczepów badanych utworzono albo od miejsca zebrania próbek porzeczek, albo od nazwy odmiany porzeczki. Do nastawu wzięto: 5 szczepów drożdży „Justowskich", 5 szczepów „Uniwersyteckich", 3 „Wersalskie" i 3 „Holenderskie".

Celem nastawu było stwierdzenie która z wyosobnionych kultur wyprodukuje wino o najwyższej zawartości alkoholu oraz o najlepszych cechach organoleptycznych.

Dla porównania wyników, otrzymanych przy użyciu wyosobnionych drożdży, z wynikami: jakie dają najlepiej odfermentowujące ten surowiec drożdże winiarskie, zaszczepiono do jednej kolbki drożdże „Tokay 3", a do drugiej „Steinberg 5".

Kontrolę wagową przebiegu fermentacji w pierwszym nastawie przeprowadzono ważąc kolbki z dokładnością do 0,1 grama co 48 godzin. Kolbki ważono w ciągu 52 dni. Wykonano 26 oznaczeń wagowych.

W wyniku dokonanych analiz stwierdzono, że w przeprowadzonej próbie najlepsze odfermentowanie, spośród wyosobnionych kultur, dały drożdże „Justowskie 5" — 11,5% obj. alkoholu.

W nastawie tym drożdże winiarskie „Tokay 3" i „Steinberg 5" wyprodukowały jednakowe ilości alkoholu po 12,4 obj. a więc o 0,9% więcej aniżeli wyosobniona kultura „Justowskie 5".

Po przeprowadzonej próbie degustacyjnej stwierdzono, że wino otrzymane przy zastosowaniu drożdży „Justowskie 5" ma aromatyczny, czysty zapach wina porzeczkowego bez ujemnych cech zapachowych i smakowych. Wobec tego przystąpiono do wyprowadzenia czystych kultur metodą kropelkową ze szczepu drożdży „Justowskie 5".

Przebieg fermentacji w trzech kolbkach zawierających po 300 ml płynu, przy użyciu drożdży „Justowskie 5", „Tokay 3" i „Steinberg 5" przedstawia wykres 1.

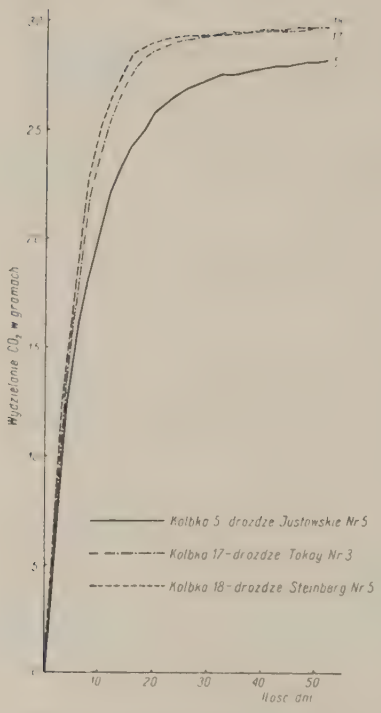
Nastaw II zrobiono w lipcu 1952 r. Moszcz porzeczkowy (z poprzedniego roku), przygotowany do nastawu, po sterylizacji miał następujące cechy fizyko-chemiczne:

ciężar właściwy (przy $15^0/15^0$)	1,0992	
kwasowość ogólna (oblicz. jako kwas winowy) .	8,3	g/litr
kwasowość lotna (jako kwas octowy) . . .	0,28	g/litr
alkohol	0	
ekstrakt	258,4	g/litr
cukry (oblicz. jako cukier inwert.)	243,2	g/litr
ekstrakt bezcukrowy	15,2	g/litr

$(NH_4)_2HPO_4$ dano do moszczu w ilości 0,3 g/litr.

Celem nastawu było stwierdzenie która z wyosobnionych metodą kropelkową 5-ciu czystych kultur drożdży da najwyższe odfermentowanie. Drożdże te, wyizolowane z kultury „Justowskie 5", nazwano drożdżami: Porzeczka 1, 2, 3, 4, 5.

W kontrolnych próbach użyto drożdże „Steinberg 5".


Wydzielanie CO_2 w gramach
Ilość dni
Kolbka 5 drożdże Justowskie Nr 5
Kolbka 17-drożdże Tokay Nr 3
Kolbka 18-drożdże Steinberg Nr 5

Rys. 1. Przebieg fermentacji w pierwszym nastawie.

Рис. 1. Чертеж хода ферментации (первая проба)

—— колба 5, дрожжи „Юстовские № 5"

—.—.— колба 17, дрожжи „Токай № 3"

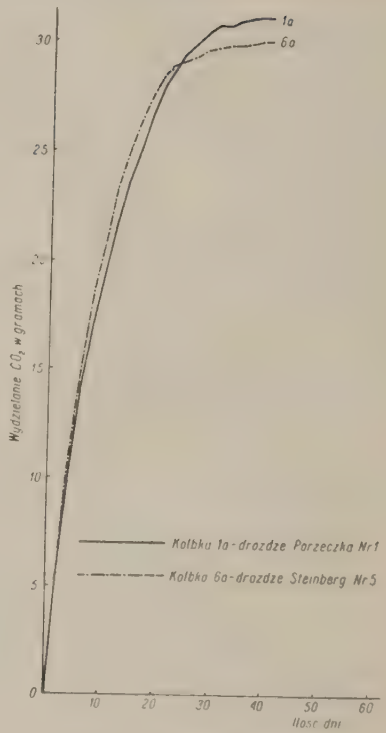
- - - - колба 18, дрожжи „Штайнберг № 5"

Fig. 1 — The course of the fermentation (first experiment)

—— The yeast „Justowskie No 5"

—.—. The yeast „Tokay No 3"

— — — The yeast „Steinberg No 5"



Rys. 2 Przebieg fermentacji w drugim nastawie.

Рис. 2. Чертеж хода ферментации (вторая проба)

—— колба 1а — дрожжи „Смородина I"

—.—. колба 6а — дрожжи „Штайнберг № 5"

Fig. 2 — The course of the fermentation (second experiment)

—— The yeast „Porzeczka No 1"

—.—. The yeast „Steinberg No 5"

Po dokonaniu analiz obciągniętego wina ustalono, że najlepsze odfermentowanie dała czysta kultura „Porzeczka 1" — 13,4% objętościowych alkoholu. Drożdże „Steinberg 5" w próbie tej wyprodukowały 12,9% objętościowych alkoholu, a więc o 0,5% mniej aniżeli wyosobnione drożdże „Porzeczka 1".

Wykres 2-gi ilustruje przebieg fermentacji w kolbce zaszczepionej drożdżami „Porzeczka 1" i w kolbie zaszczepionej drożdżami „Steinberg 5". Kolbki zawierały po 300 ml płynu.

Nastaw III zrobiono w sierpniu 1952 r. Surowy moszcz przygotowany do nastawu miał następujące cechy fizyko-chemiczne:

ciężar właściwy (przy $15^0/15^0$) 1,1087
kwasowość ogólna (jako kwas winowy) 8,8 g/litr
kwasowość lotna (jako kwas octowy 0,34 g/litr
alkohol 0
ekstrakt 283,5 g/litr
cukry (oblicz. jako cukier inwert. 268,0 g/litr
ekstrakt bezcukrowy 15,5 g/litr

Do moszczu dodano dwuzasadowego fosforanu amonowego w ilości 0,3 g/litr.

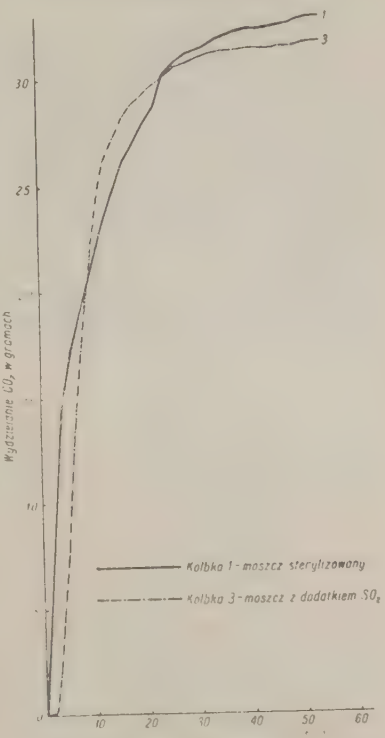
Do kolbek 1, 1a, 2, 2a dano moszcz sterylizowany. Do kolbek 3, 3a, 4, 4a dano moszcz surowy z dodatkiem pirosiarczynu potasowego w ilości 200 mg/litr

Kolbki ważono w ciągu 54 dni. Przy wagowej kontroli przebiegu fermentacji w trzecim nastawie wykonano 224 oznaczenia.

Celem nastawu było sprawdzenie jak wysokie odfermentowanie na świeżym moszczu porzeczkowym (z bieżącego roku) dadzą czyste kultury „Porzeczka" 1 i 2, oraz jak zachowają się te szczepy w obecności kwasu siarkawego.

Fermentacja w kolbkach z dodatkiem kwasu siarkawego w pierwszych dniach uległa zahamowaniu, później jednak dzięki intensywniejszemu przebiegowi niż w kolbkach z moszczem sterylizowanym, już po 10 dniach stopień jej uległ wyrównaniu.

W wyniku przeprowadzonych analiz obciągniętego wina po zakończonej fermentacji stwierdzono obecność alkoholu:



Rys. 3. Przebieg fermentacji w trzecim nastawie przy zastosowaniu wyosobnionych drożdży „Porzeczka 1".
Рис. 3. Чертеж хода ферментации (третья проба) при применении изолированных дрожжей „Смородина I"
—— колба 1 — сусло стерильное
——. колба 3 — сусло с добавкой SO_2
Fig. 3 — The course of the fermentation (third experiment)
the yeast „Porzeczka No 1"
—— after sterylisation
——. after the addition of SO_2

a) w kolbach z moszczem sterylizowanym	b) w kolbach z moszczem zawierającym SO_2
1 — 13,8% objętości	3 — 13,2% objętości
2 — 12,4% „	4 — 13,2% „

Z tego wynika, że wyosobnione drożdże są wyraźnie odporne na kwas siarkawy dodany do moszczu w ilości około 100 mg/litr.

Przebieg fermentacji w kolbkach 1 (moszcz sterylizowany) i 3 (moszcz z dodatkiem SO_2), zawierających po 300 ml płynu, zaszczepionego drożdżami „Porzeczka 1" ilustruje wykres 3.

Dostosowanie do zmian w środowisku. Już po wyosobnieniu metodą płytkową (1951) poszukiwanych drożdży, zaczęto je stopniowo przystosowywać do coraz wyższego stężenia cukrów. Hodowla była prowadzona na moszczach porzeczkowych z dodatkiem sacharozy.

Po osiągnięciu w pożywce zawartości cukrów 27g/100 ml (jako cukry inwert.) dawki nie zwiększano. Przy tej zawartości prowadzona jest nadal hodowla drożdży „Porzeczka 1".

3. FERMENTACJA CUKROW DIAGNOSTYCZNYCH

Próbę fermentowania cukrów diagnostycznych przeprowadzono na pożywce półsyntetycznej o następującym składzie:

kwas cytrynowy	0,7 %
fosforan dwuwapniowy	0,05 %
chlorek potasu	0,02 %
chlorek sodu	0,01 %
siarczan magnezu	0,03 %
siarczan żelazawy	0,005%
siarczan amonu	0,5 %
wyciąg drożdżowy	10,0 %
jeden z cukrów diagnostycznych	10,0 %
woda wodociągowa	78,685%

Po upływie 48 godzin od momentu zaszczepienia drożdżami „Porzeczka 1" pożywek w probówkach stwierdzono, że:

Drożdże	Fermentowały			Nie fermentowały
	silnie	słabiej	najsłabiej	
„Porzeczka 1"	glukozę fruktozę sacharozę	maltozę rafinozę	mannozę galaktozę	laktozy

Dalsze obserwacje nie wniosły zmian do powyższych danych.

4. PRÓBA NA SKALĘ TECHNICZNĄ

Osiągnięte wyniki w nastawach na skalę laboratoryjną pozwoliły na przeprowadzenie prób w przemyśle winiarskim.

W lipcu 1953 r. przeprowadzono próbę na skalę techniczną w wytwórni win w Krakowie. Do nastawu użyto moszcz o zawartości: 25° sok porzeczkowy + 25% sok wiśniowy + 50° woda z cukrem. Bezwodnika kwasu siarkawego dodano w ilości 100 mg na litr.

Kutę o pojemności 990 litrów zaszczepiono wyosobnionymi drożdżami „Porzeczka 1". Drugą kutę o pojemności 740 litrów zaszczepiono świeżo otrzymanymi drożdżami „Tokay 22", którą w kolekcji drożdży oddziału GIPRiS w Krakowie są jednymi z najwyżej odfermentowujących. Temperatura w lokalu, w którym odbywała się fermentacja, wynosiła 20 — 25°.

Fermentacja trwała 28 dni. W kutie zaszczepionej drożdżami „Porzeczka 1" miała ona przebieg charakterystyczny dla fermentacji winiarskiej. Wynik analizy wina po pierwszym obciągu, wyprodukowanego przy zastosowaniu drożdży „Porzeczka 1" przedstawia się następująco.

alkohol	16,1	% objętości
ekstrakt ogólny	51,7	g/litr
cukier	30,1	g/litr
ekstrat bezcukrowy	21,6	g/litr
kwasowość ogólna (jako kwas winowy)	6,8	g/litr
kwasy lotne (jako kwas octowy)	0,9	g/litr
popiół	2,24	g/litr

Drożdże „Tokay 22" wyprodukowały wino o zawartości 15,6% objętościowych alkoholu.

Na leżakowni, z powodów niezależnych od autora, trzymano wino z próbnego nastawu tylko trzy tygodnie. Na podstawie tak krótkiego czasu nie można scharakteryzować, jak ono dojrzewało. Klarowało samoczynnie bardzo dobrze. W wyniku próby degustacyjnej oceniono je jako wino dobre.

Druga próba na skalę techniczną została przeprowadzona w sierpniu 1953 r. w Lanckorońskiej Wytwórni Win w Kalwarii. W próbie tej zaszczepiono kontrolną kutę drożdżami „Steinberg 5", gdyż w wytwórni w Kalwarii stosuje się te drożdże do surowca porzeczkowego.

Nastaw sporządzono na wino białe wytrawne i białe półwytrawne. Fermentacja dobrze zapowiadająca się w początkowej fazie, została później (jak podano w protokóle z przeprowadzonej próby) zahamowana wskutek wysokiego skoku temperatury *) w lokalu. Drożdże we wszystkich kutach (5) zostały tak osłabione, że szczep „Steinberg 5" (kuta kontrolna nr 6) potrzebował aż 55 dni na wyprodukowanie wytrawnego wina o zawartości 11,5% objętościowych alkoholu. Drożdże „Porzeczka 1"

*) Podniesienie się temperatury nastąpiło z powodu panujących upałów.

w tych samych, trudnych dla fermentacji, warunkach odfermentowały 11,9% objętościowych alkoholu w czasie o tydzień krótszym (48 dni).

Mimo szybkiego i wyższego odfermentowania przy zastosowaniu drożdży „Porzeczka 1", aniżeli przy zastosowaniu drożdży winiarskich „Steinberg 5", próba ta nie dała właściwego obrazu przydatności wyosobnionych drożdży, ponieważ podczas przeprowadzania jej wytworzyły się niekorzystne warunki dla fermentacji.

DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach nad wyosobnionymi drożdżami „porzeczkowymi" przede wszystkim starano się ustalić przynależność gatunkową drożdży „Porzeczka 1" na podstawie ich cech morfologicznych i biochemicznych. Następnie zbadano w jakim stopniu i w jakim czasie są one zdolne odfermentowywać sacharozę oraz czy wyprodukowane wino ma zharmonizowane cechy smakowe i zapachowe.

Jako pierwszą z najważniejszych cech przy identyfikacji drożdży P r e s c o t t (1952) wymienia kształt i wielkość komórek. Jak już wspomniałem, komórki wyosobnionych drożdży były przeważnie elipsoidalne, a wyjątkowo zdarzały się okrągłe. P i j a n o w s k i (1950) podaje, że typowa komórka owalna rodzaju *Saccharomyces* ma wymiary około 4 do 8μ. Najczęściej spotykana szerokość komórek „Porzeczki 1" wynosiła 4,8 μ, a długość 7,4 μ. L l o y d H i n d (1948) dla *Saccharomyces cerevisiae v. ellipsoideus* podaje wymiary: (2,5 — 6,5) μ × × (4,5 — 9,5) μ. Autor ten podaje wymiary komórek drożdży niepożądanych w browarnictwie, gatunków rodzaju *Saccharomyces* i odmian gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Po zmierzeniu 100 komórek ze szczepu „Porzeczka 1" stwierdzono, że wielkość ich waha się w granicach: 3,6 — 6,9 μ × 4,8 — 9,7 μ.

Drożdże te rozmnażały się przez pączkowanie w pożywce płynnej. Kiedy dano je na bloczek gipsowy i umieszczono w temperaturze 25° wytworzyły askospory po 68 godzinach. Stwierdzona przy obserwacjach mikroskopowych liczna obecność worków z zarodnikami jest według H e n n e b e r g a (1926) charakterystyczna dla drożdży winiarskich.

Podawany przez różnych autorów czas potrzebny do wytworzenia zarodników przez drożdże właściwe jest znacznie krótszy (J ö r g e n s e n 1940 — 21 godzin) niż został stwierdzony w przeprowadzonych próbach.

Okrągłe zarodniki były typowe dla *Saccharomyces cerevisiae v. ellipsoideus* (S a ɹ e n k o 1947). Powstały one partenogenetycznie.

Układ zarodników w workach był różny. Między innymi spotykano nieliczne worki z zarodnikami leżącymi rzędem. Takiego ułożenia nie spotkano ani razu u wyosobnionej kultury drożdży do win czerwonych „Borówka 3" (J a n k u n 1953).

Hodowla szczepu „Porzeczka 1" na pożywkach o zwiększonej zawartości (od 15—27 g/100 ml jako inwert.) cukrów dała widoczne rezultaty. Zaczęto je dostosowywać do coraz wyższego stężenia cukru w pożywce od 1951 r. W sierpniu 1952 r. w próbie na skalę laboratoryjną wyprodukowały 13,8% objętościowych alkoholu, a w lipcu 1953 r. w próbie na

skalę techniczną — 16,1% objętościowych alkoholu. Osiągnięte wyniki pozwalają na zastosowanie wyosobnionych drożdży w przemyśle winiarskim.

Kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej GIPRIS w Krakowie Dr Inż. K. Matusiakowi wyrażam podziękowanie za udzielone mi rady. Ob. Al. Wicińskiej dziękuję za pomoc techniczną. Inż. R. Kowaczowi z Kalwarii i Ob. T. Sahajdakowi z Krakowa dziękuję za przeprowadzenie prób na skalę techniczną.

A. Янкун

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ШТАММОМ ДРОЖЖЕЙ „СМОРОДИНА 1" ИЗОЛИРОВАННЫМ ИЗ МИКРОФЛОРЫ ВЫСТУПАЮЩЕЙ НА КРАСНОЙ СМОРОДИНЕ

Резюме

1. Для проверки какое значение имеют для винодельческой промышленности соответственные дрожжи, находящиеся на плодах растений распространённых в Польше, были изолированы чистые культуры дрожжей из микрофлоры выступающей на красной смородине (*Ribes rubrum* L.).

2. Автор проверил их морфологические свойства и способ размножения, причем обнаружил:

а) наличие дрожжей образующих колонии типичные для рода *Saccharomyces*

б) морфологическую структуру дрожжевых клеток и их размеры, характерные для *Saccharomyces cerevisiae v. ellipsoideus* (H.) D.

в) размножение путем почкования и образования спор соответствующих по своей форме виду *Saccharomyces cerevisiae v. ellipsoideus*.

3. Была подвергнута исследованию способность к ферментации изолированных культур.

4. Постоянно разводились изолированные расы на сусле с возрастающим содержанием сахаров, до 27 г/100 мл, (как инзерт).

5. Дальнейшими исследованиям был подвергнут дрожжевой штамм (Смородина 1) обладающий самой сильной способностью к брожению, причем обнаружено:

а) ферментацию при содержании сахаров 26,8 г/100 мл (рассчитываных как простые сахары), результатом которой было образование 13,8% объема алкоголя.

б) быстрое и самостоятельное осветление вина.

в) ясно выраженную устойчивость против H_2SO_3 типичную для собственных дрожжей.

г) период главного брожения не уступал периоду брожения самых лучших винодельческих дрожжей.

д) способность ферментации следующих диагностических сахаров: глюкозы, фруктозы маннозы, галактозы, мальтозы сахарозы и рафинозы. Лактозы не бродили.

ж) при первом опыте в техническом масштабе проведенном после годового селекционного воздействия среды на изолированные дрожжи было получено вино содержащее 16,1% объема алкоголя. Брожение продолжалось 26 дней

Из вышесказанного следует:

1. Среди дрожжевой микрофлоры, обнаруженной на красной смородине (*Ribes rubrum* L.) выступают дрожжи обладающие свойствами, напоминающими свойства вида *Saccharomyces cerevisiae v. ellipsoideus* (H.) D.

2. Некоторые из них культивированные на среде с возрастающим количеством сахара, приобретают свойства характерные для сильных рас винодельческих дрожжей.

3. Штамм дрожжей „Смородина 1" изолированный из красной смородины, употребляемый для производства вина, не уступает винодельческим дрожжам количеством продуцированного ими алкоголя и устойчивостью против SO_2.

A. Jankun

INVESTIGATION IN THE YEAST STRAIN CURRANT 1 ISOLATET FROM THE MICROFLORA OCCURRING ON RED CURRANT

Summary

In order to test the value — for the wine-producing industry — of the proper yeasts appearing on fruits of plants widely spread in Poland, pure cultures of yeasts were isolated from the microflora occurring on fruits of red currant (*Ribes rubrum* L.).

Their morphological features as well as their way of reproduction were examined with the following results:

a) The presence of yeasts forming colonies typical of strains of *Saccharomyces* was established.

b) The yeast cells had the morphological structure and the dimensions characteristic of *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus* (H.) D.

c) Reproduction by way of budding and forming of spores the shape of which corresponded to that of *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus.*

The isolated cultures have been investigated in respect of their capacity of fermentation.

Isolated pure cultures were continuously bred on juices with gradually increased contents of sugars, up to 27 gm per 100 ml, as invert.

Further examination of a selected yeast culture with the highest capacity of fermentation (Currant 1), has proved the following:

a) Fermentation of sugars amounting to 26,8 gm per 100 ml (as monosaccharids) resulted in the production of 13,8 per cent of alcohol.

b) A quick self-clarifying of wine.

c) A definite resistance to H_2SO_3 characteristic of the proper wine-yeasts.

d) The period of main fermentation was equivalent to the period of fermentation of the best wine-yeast strains.

e) A fermentation of the following diagnostic sugars: glucose, fructose, mannose, galactose, maltose, sucrose, raffinose. Lactose was not fermented.

f) In the first technical test made after a year of selecting influence of the environment on isolated yeasts, wine containing 15% of alcohol was obtained. The fermentation period lasted 28 days.

LITERATURA

1. Flerow A. F. i Kowalenko N. N., 1949: Drożżi niekotorych płodow i jagod i ich krugoworot w pnirodie. *Mikrobiołogia*, **18**: 163.
2. Frołow — Bagriejew A. M., Agabalianc G. G., 1951: Chimija wina. Piszczepromizdat. Moskwa.
3. Gierasimow M. A., 1952: Tiechnołogija winodielija. Piszczepromizdat. Moskwa.
4. Henneberg W., 1926: Handbuch der Gärungsbakteriologie. Verlagsbüchhandlung Paul Parey. Berlin.
5. Jankun A., 1953: Wyprowadzenie czystej kultury drożdży występujących na borówce czernicy i zbadanie jej zdolności fermentacyjnej. Prace GIPRiS, Rok (1953), z. 1. PWT. Warszawa.
6. Jörgensen A., 1940: Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. Jena.
7. Krauze S., 1948: Materiały do Polskiego Kodeksu Żywnościowego. Farm. Inst. Wyd. Warszawa.
8. Lindner P., 1930: Mikroskopische und biologische Betriebskontrole in den Gärungsgewerben. Berlin.
9. Lloyd Hind H., 1948: Brewing science and practice. Chapman a. Hall Ltd. London.
10. Matuszewski T., 1947: Wstęp do mikrobiologii rolniczej. Państw. Instyt. Nauk. Gospod. Wiejsk. Puławy.
11. Pijanowski E., 1950: Zarys technologii winiarstwa. PWT. Warszawa.
12. Prescott S. i Dunn C., 1952: (tłum. rosyjskie) Tiechniczeskaja mikrobiołogia. Izdat. Inost. Lit. Moskwa.
13. Sajenko N. F., 1947: Drozzi Chierniesa. Biochimija winodielja. Akad. Nauk ZSRR. Moskwa.
14. Szember A., 1951: Mikroflora drożdżowa owoców krajowych. *Annales Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sectio E.* 1950, 221.
15. Tilgner D. J., 1952: Ocena organoleptyczna żywności. *Przem. Rolny i Spoż.*, **6**: 106, i **6**: 419.

J. Iskierko, M. Sabbo i *R. Franaszczyk*

PODŁOŻE Z HYDROLIZATEM FASOLI DLA WZROSTU *HAEMOPHILUS PERTUSSIS*

Z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie
Wpłynęło dnia 12.V.1954 r.

Podstawowym składnikiem podłoża półsyntetycznego płynnego dla wzrostu pałeczek krztuśca jest hydrolizat kazeiny. Przedstawia on pod względem chemicznym mieszaninę 14-tu różnych aminokwasów oraz szereg związków bardziej złożonych — wielopeptydów.

Dodatkowymi składnikami tego podłoża są różne sole mineralne jak na przykład: KCl, NaCl, KH_2PO_4, Na_2CO_3, $MgCl_2$, $CaCl_2$, potrzebne do wzrostu zarazka kokluszu.

Cohen i Wheeler wprowadziły do podłoża dializat drożdży wchodzący również w skład pożywki Hornibrooka zmodyfikowanej przez Janczurę, Waleckiego i Wojciechowskiego (1950). Do podłoża dodaje się ponadto skrobię i cystynę, a niektórzy autorzy uważają za korzystne dodawanie takich składników jak na przykład: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ i kwasu nikotynowego. Wilson, Farrell i Taylor (wg Verwey, 1949) stosują ekstrakt wątrobowy.

Szereg autorów podaje własne modyfikacje podłoża półsyntetycznego różniące się zasadniczo tylko ilością poszczególnych składników. Badacze ci wychodzą z tego samego podstawowego składnika, to jest hydrolizatu kazeiny.

Wymienieni w tabeli I autorzy podają różne optymalne pH dla wzrostu pałeczek krztuśca: Hornibrook pH 7,4; Wilson 7,0; Farrell i Taylor 7,1; Cohen i Wheeler od 5,3 — 7,2; Verwey 6,8; Janczura; Walecki i Wojciechowski (1950) zalecają doprowadzenie pH przed sterylizacją do 6,8, ponieważ potem wzrasta ono do pH 7,1.

BADANIA WŁASNE

Podłoże przygotowane przez nas różni się całkowicie od podanych przez szereg autorów różnych modyfikacji zestawionych w tabeli I. Mianowicie zmieniono podstawowy składnik podłoża — hydrolizat kazeiny, zastępując go hydrolizatem fasoli. Podobnie jak w podłożu Farrella

TABELA I

Skład różnych podłoży *) (składniki podano w g/l)

Состав питательных сред для *H. pertussis*.

The composition of various media for cultivating of *H. pertussis* (grams per l).

Składniki	Hornibrook	Wilson	Farrell i Taylor	Cohen i Wheeler	Verwey
hydrolizat kazeiny	7,0	10,0	10,0	6,0	9,4
NaCl	5,0	5,0	5,0	6,5	4,6
KCl	0,2	0,2	0,2	—	0,2
$CaCl_2$	0,2	0,02	—	0,1	—
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1	0,025	—	0,4	0,1
Na_2CO_3	0,5	0,4	—	—	—
KH_2PO_4	0,25	0,25	0,4	0,5	0,5
Skrobia	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0
Cyteina	0,01	0,01	0,022	0,025	0,01
Dializat drożdży	—	—	—	50 ml	—

*) wg Verwe'a (1949).

i T a y l o r a (1949) nie dodano do przygotowanej przez nas pożywki chlorku wapnia i chlorku magnezu oraz zmniejszono ilość chlorku potasu. Przeprowadzone przez nas próby wykazały, że dodatek chlorku wapnia i chlorku magnezu powoduje w wyższej temperaturze wytrącenie fosforanu wapnia i fosforanu magnezu w postaci zawiesiny. Drugim aspektem wykluczenia dodatku chlorku wapnia i chlorku magnezu z podłoża było to, że potrzebna zawartość jonów Ca^{++} i Mg^{++} dla wzrostu pałeczek krztuśca znajduje się zarówno w fasoli jak i w kazeinie. Zmniejszono również ilość chlorku potasu uważając, że dodatkowym źródłem potasu w pożywce jest kwaśny fosforan potasowy. Dodatek kwaśnego fosforanu potasu do podłoża ma na celu zbuforowanie środowiska i uniemożliwia jego większą alkalizację, która wpłynęłaby hamująco na rozwój pałeczek krztuśca (V e r w e y 1949).

Skład podłoża z hydrolizatem fasoli przedstawia się zatem następująco:

KCl	0,15
Na_2CO_3	0,40
KH_2PO_4	0,25
Skrobia	0,70
Cystyna	0,0125
Dializat drożdży	50,0
	pH 6,5 (przed wyjałowieniem)

Zastąpienie kazeiny fasolą ma swoje uzasadnienie ze względu na podobny skład aminokwasowy jaki wykazuje kazeina i fazeolina.

TABELA II

Skład aminokwasów kazeiny i fazeoliny po hydrolizie kwaśnej
Аминокислотный состав казеина и фазеолина после кислого гидролиза
The amino-acid composition of casein- and bean-hydrolyzates

Aminokwasy	Kazeina mleka %	Fazeolina fasoli %
Glicyna	0,45	—
Walina	7,20	—
Leucyna	10,50	9,65
Prolina	6,70	2,77
Feniloalanina	3,20	3,25
Kwas asparaginowy	1,40	5,30
Kwas glutaminowy	15,55	14,54
Tyrozyna	4,50	1,55
Arginina	3,81	4,89
Histydyna	2,50	2,62
Lizyna	5,95	4,58
Alanina	—	1,80

wg Matuszewski i Supińska-Jakubowska 1949 oraz Sojfar 1952.

Ponieważ fazeolina jak i kazeina po hydrolizie kwaśnej nie posiadają bardzo ważnego pod względem fizjologicznym aminokwasu cystyny, biorącej udział w procesie oddychania i działania enzymów proteolitycznych, niedobór tego aminokwasu uzupełniono dodając do podłoża cystynę. W hydrolizacie białka fasoli brakuje również i innych aminokwasów jak na przykład: glicyny, waliny, metioniny i tryptofanu. Natomiast znajduje się w nim alanina, której nie stwierdzono w kazeinie. Dodatkowymi, wartościowymi składnikami hydrolizatu fasolowego jest glukoza otrzymana z kwaśnej hydrolizy skrobii zawartej w fasoli, oraz fosfatydy i lecytyny.

METODYKA PRZYGOTOWANIA HYDROLIZATU FASOLI

Fasolę w łupinkach w ilości 80 g zalewano 1 l 3,1 N kwasu solnego, a następnie hydrolizowano na silnym płomieniu palnika przez 8 godzin w kolbie okrągłodennej z chłodnicą zwrotną. Po tym czasie otrzymano jednorodny czarny, mętny hydrolizat fasoli. Po ostygnięciu sączono go i oddestylowano w próżni, aż do chwili otrzymania gęstej masy. Pozostałość tę rozcieńczono 1 l wody i po dodaniu około 20 g węgla aktywowanego gotowano przez 10 minut w celu odbarwienia. Po odsączeniu doprowadzono pH do 7,2 i hydrolizat gotowano około 10 minut, przy czym wytrącał się osad. Po odsączeniu wytrąconego osadu uzyskano 1 l hydrolizatu, który doprowadzono do pH 6,5 za pomocą kwasu solnego.

Przygotowany hydrolizat fasoli poddano analizie na zawartość azotu całkowitego, azotu aminowego i chlorków. Porównanie wyników analizy hydrolizatu fasoli i kazeiny przedstawia tabela III.

TABELA III

Zawartość azotu (całkowitego i amin.) w kwaśnych hydrolizatach kazeiny i fasoli
Содержание N (полного и аминового) в кислых гидролизатах казеина и фасоли
Total nitrogen and amino-nitrogen content of the casein- and of bean-hydrolyzate.

Lp.	Hydrolizat fasolowy			Hydrolizat kazeinowy		
	azot aminowy mg/ml	azot całkowity mg/ml	chlorki %	azot aminowy mg/ml	azot całkowity mg/ml	chlorki %
1	1,21	2,69	3,1	2,81	5,6	1,9
2	1 3	2,92	2,6	2,1	4,9	2,3
3	1,12	2,6	2,3	2,9	5,5	1,7
4	1,35	3,1	2,05	3,1	5,7	1,85
5	1,15	2,7	2,2	3,0	5,75	1,6

Azot aminowy oznaczono metodą Poppe-Sterensa. Azot całkowity metodą Kjeldahla, chlorki metodą Mohra.

Jak wynika z tabeli III ilościowa zawartość azotu aminowego i azotu całkowitego w hydrolizacie fasolowym jest znacznie mniejsza niż w hydrolizacie kazeinowym.

Tabela IV obrazuje wyniki analizy zawartości azotu aminowego, całkowitego i chlorków w gotowym podłożu fasolowym i kazeinowym przed posiewem i po inkubacji hodowli *H. pertussis.*

TABELA IV

Zawartość azotu aminowego, całkowitego i chlorków w podłożu fasolowym i kazeinowym przed posiewem i po inkubacji
Содержание N (полного и аминового) и хлоридов в фасолевой и казеиновой средах до и после инкубации.
Total nitrogen and amino-nitrogen content of the „casein"-and „bean"-media before and after the incubation of *H. pertussis* cultures.

Podłoże fasolowe			Podłoże kazeinowe		
azot aminowy w mg/ml			azot aminowy w mg/ml		
chlorki %	przed inkubacją	po inkubacji	chlorki %	przed inkubacją	po inkubacji
0,76	0,28	0,20	0,52	0,7	0,6
0,82	0,2	0,18	0,76	0,85	0,72
0,86	0,38	0,29	0,8	0,73	0,62
0,86	0,24	0,19	0,8	0,6	0,51
0,67	0,32	0,21	0,73	0,76	0,63

Do posiewu na nowym podłożu użyto trzech szczepów *H. pertussis* oznaczonych S, J, L. Szczepy te uprzednio przeprowadzono przez organizm myszek. Wzięte do badań szczepy dawały z surowicą królika uodpornionego pałeczkami krztuśca (rozcieńczoną 1:20) odczyn aglutynacyjny dodatni. W próbie kontrolnej z płynem fizjologicznym aglutynacji nie dawały. Wysiane na pożywkę stałą Bordet-Gengou rosły tylko w obecności 20 — 25% odwłóknionej krwi baraniej, tworząc kolonie okrągłe, wypukłe, biało-niebieskie. Na agarze zwykłym i agarze z surowicą nie rosły. Posiewy na podłoże fasolowe robiono z pożywki stałej Bordet-Gengou. Wzrost wszystkich szczepów na podłożu płynnym był obfity i typowy, drobno-kłaczkowaty. Na ściance płaskiej butelki, pałeczki krztuśca tworzyły charakterystyczny nalot spłukujący się łatwiej niż uzyskany z podłoża półsyntetycznego Hornibrooka wg modyfikacji Janczury, Waleckiego i Wojciechowskiego. Średnia gęstość hodowli uzyskana na nowym podłożu wynosiła 25 miliardów w jednym ml (wg skali Mc Farlanda).

Hodowlę pałeczek krztuśca uzyskaną na nowym podłożu, przesiewano na pożywkę stałą Bordet-Gengou, podłoże półsyntetyczne wg Hornibrooka oraz na podłoże z hydrolizatu fasoli. Wzrost *H. pertussis* na wszystkich podłożach był obfity. Wygląd pałeczek nie uległ zmianie. W preparatach barwionych metodą Grama — pałeczki krztuśca wyhodowane na nowym podłożu były drobne, barwiły się równomiernie, lecz intensywniej niż pałeczki krztuśca uzyskane z hodowli na podłożu kazeinowym.

Nefelometryczne pomiary gęstości zawiesiny bakteryjnej wykazały na podłożu fasolowym wzrost obfitszy od 5 — 20% niż na podłożu kazeinowym.

Myszka zaszczepiona 0,25 ml hodowli płynnej o gęstości 10 miliardów w 1 ml padła na 4-ty dzień. Z mózgu padłej myszki wykonano posiew na podłoże stałe Bordet-Gengon. Po 48 godzinach inkubacji wyrosły kolonie charakterystyczne dla *H. pertussis*.

Hodowla otrzymana na nowym podłożu, przelana do kolb z perełkami, po kilku dniach zbijała się w kłaczki, które w odróżnieniu od zawiesiny otrzymanej na podłożu kazeinowym łatwo uległy rozbiciu. Po dodaniu 0,5% fenolu, hodowla ciemniała szybko w przeciwieństwie do hodowli na podłożu Hornibrooka według modyfikacji Janczury, Waleckiego i Wojciechowskiego, która również ciemnieje, lecz dopiero po upływie 10 — 14 dni. Badano również odczyn aglutynacyjny metodą szkiełkową, używając surowicy w rozcieńczeniu 1:20.

W celu uzyskania szczepionki dodawano do hodowli 0,5% fenolu, rozbijano kłaczki i rozcieńczano płynem fizjologicznym zawiesinę do gęstości 10 miliardów na 1 ml. Szczepionka nie wykazała toksyczności ubocznej. Myszki zaczepione nie padły i nie wykazały żadnych objawów chorobowych.

И. Искерко, М. Саббо и Р. Франащик

СРЕДА С ГИДРОЛИЗАТОМ ФАСОЛИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *HAEMOPHILUS PERTUSSIS*

Резюме

Авторам удалось приготовить среду с гидролизатом фасоли для культивирования *Haemophilus pertussis*. Среднее количество бактерий на этом субстрате составляло 25 миллиардов на 1 мл взвеси. У культивированных на фасолевом субстрате бактерий не обнаружено никаких морфологических изменений, а полученная противкоклюшевая вакцина вовсе не отличалась своими лечебными свойствами от вакцины приготовленной на казеиновом субстрате, а также не проявляла побочной токсичности.

Принимая во внимание, что аминокислотный состав белков казеина и фасоли почти аналогичен, а также опираясь на проведенные до сих пор биологические пробы, авторам кажется, что новую среду можно использовать для продукции противкоклюшевых вакцин, причем можно бы добиться значительного снижения себестоимости, так как цена 1 кг фасоли почти в 10 раз меньше цены 1 кг казеина.

J. Iskierko, M. Sabbo and *R. Franaszczyk*

THE BEAN HYDROLYZATE MEDIUM FOR CULTIVATION OF *HAMOPHILUS PERTUSSIS*

Summary

It was showed that in the medium for *Haemophilus pertussis* cultivation the casein-hyrolyzate could be replaced with the bean-hydrolyzate. The total nitrogen and amino-nitrogen in Cohen-Wheeler medium and in the medium with bean-hydrolyzate was measured.

The growth of *H. pertussis* on the new medium was as good as on the Cohen Wheeler medium. No changes in morphological and antigenic characteristics of bacteria were noted.

The vaccine prepared on the new medium is now tested.

The replacing of casein-hydrolyzate with the bean-hydrolyzate is justified also on the economical grounds.

LITERATURA

1. Janczura E., Wojciechowski E. i Walecki H., 1950: Doświadczenia na półsyntetycznym podłożu płynnym hodowli krztuśca., *Med. Dośw. i Mikrob.*, 2 : 126.
2. Koplański S., 1952: Biełki i aminokisłoty w pitaniu czełowieka i żiwotnych., Izdatielstwo Inostrannoj Litieratury. Moskwa.
3. Matuszewski T. i Supińska-Jakubowska J., 1949: Mikrobiologia Mleczarska, PIWR. Warszawa.
4. Sojfar P. A., 1952: Opriedielenie sierusodierżaszczych aminokisłot i biołogiczeskoj cennosti biełkow fasoli., *Biochimia*, **17** : 307.
5. Verwey W. E., 1949: A simplefied liquid maltose medium for the growth of *Haemophilus pertussis.*, *J. Bact.*, **58**.

T. Jastrzębski

BADANIA NAD WYDAJNOŚCIĄ SUROWICY PRZY RÓŻNYCH METODACH PRZEROBU KRWI *)

Z Katedry Mikrobiologii Wet. U. M. C. S. w Lublinie
Wpłynęło dnia 3.XI.1954 r.

W związku z umasowieniem lecznictwa i profilaktyki w medycynie i weterynarii zużycie surowic leczniczych w Polsce uległo bardzo poważnemu zwiększeniu, a zagadnienie obniżenia kosztów produkcji stało się sprawą o dużym znaczeniu gospodarczym.

Jednym z najskuteczniejszych sposobów obniżenia kosztów własnych produkcji jest zwiększenie wydajności surowicy to jest ilości surowicy pełnej, naturalnej (nierozcieńczonej, ani też skoncentrowanej w trakcie przerobu i konserwacji) otrzymanej ze 100 ml krwi.

Wydajność surowicy zależy od jakości (a zwłaszcza stopnia uwodnienia) przerabianej krwi oraz od technologii przerobu krwi.

Niniejsza praca zajmuje się tylko tą drugą sprawą, to jest wpływem na wydajność trzech metod przerobu krwi, które nazwiemy tu metodą krzepnienia, metodą odwłókniania i metodą plazmatyczną.

BADANIA WŁASNE

Badania zostały wykonane głównie w Drwalewskich Zakładach Przemysłu Bioweterynaryjnego w Drwalewie na koniach i buhajach, służących do produkcji surowic.

Ponieważ wstępne próby wykazały u pojedynczych zwierząt poszczególnych grup, nawet zupełnie jednakowo żywionych i eksploatowanych, bardzo duże wahania w wydajności surowicy, wszystkie doświadczenia wykonywano na krwi mieszanej pobranej proporcjonalnie z całej grupy zwierząt. Na przykład chcąc otrzymać 20 kg krwi do przebadania nowej metody oraz 10 kg dla kontrolnego przerobienia metodą starą, wybierano grupę zwierząt np. 10 sztuk w możliwie jednakowym etapie eksploatacji i pobierano od nich jednocześnie po 2 kg krwi dla metody nowej oraz 1 kg dla metody starej. Aby jakość krwi pod koniec upustu nie ule-

*) Za pomoc techniczną w wykonaniu doświadczeń, składam serdeczne podziękowania lek. wet. W. Owocowi, technikowi wet. J. Piotrowskiemu i technikowi wet. L. Kondratowiczowi.

gła zmianie, upust wykonywano zawsze jak najszybciej, używając igieł upustowych o dużym świetle.

Jako metodę zasadniczą, z którą porównywano inne metody, przyjęto metodę krzepnienia według techniki stosowanej w Drwalewskich Zakł. Przem. Biowet. Według tej metody krew pobiera się do cylindrów upustowych szklanych o średnicy 9 cm do wysokości ca 35 cm i po skrzepnięciu, tegoż dnia lub następnego rano ciężarkuje się ciężarkiem metalowym, cynowanym wagi ca 400 g. Zlew surowicy wykonuje się po raz pierwszy trzeciego, a po raz drugi czwartego dnia po upuście. Niekiedy stosuje się jeszcze III zlew na szósty dzień po upuście. Surowicę zlaną przy drugim i trzecim upuście, ze względu na możliwość zakażenia, zlewa się oddzielnie. Surowicę konserwuje się przez dodanie na 9 części surowicy 1 części 5% fenolu.

DOŚWIADCZENIE I

Celem tego doświadczenia było porównanie wydajności, wyglądu i miana przy dłuższym przechowywaniu surowicy przeciwróżycowej otrzymanej trzema wyżej wymienionymi metodami. Wyniki podaje tabela I.

Przy metodzie „odwłókniania" krew odwłókniano w defibrynatorze typu kierżanki (kółko z otworami, przesuwane w górę i w dół, jak przy robieniu masła) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Krew odwłóknioną i przefiltrowaną przez gazę odwirowywano na wirówce typu De Leval DH 4. Odrzucony włóknik ważył 470 g co stanowi 4,25% (stratę należy uznać za bardzo małą, gdyż często straty są o wiele większe).

Przy metodzie „plazmatycznej" pobrano po 2,5 kg krwi od konia do butli zawierającej 500 g 10% roztworu cytrynianu sodu. Po wymieszaniu krew przepuszczono przez separator De Leval DH 4 otrzymując ogółem 6,635 g plazmy. Plazma miała jasnosłomkowy kolor. Do plazmy dodano 490 g 5% fenolu zmieszanego z 130 g 10% chlorku wapnia. Otrzymany galaretowaty skrzep wygnieciono w worku flanelowym w prasie od owoców, otrzymując 7,000 g zakonserwowanej, jasnosłomkowej surowicy o zmniejszonej lepkości. Dla obliczenia zawartej w niej ilości surowicy pełnej, naturalnej, przyjęto, że przy wirowaniu z 500 g roztworu cytrynianu przeszło do plazmy 63,2% (tj. tyle ile wyniosła wydajność w stosunku do krwi z cytrynianem) czyli 316 g płynu, a przy dodawaniu do plazmy chlorku wapnia i fenolu jeszcze 620 g czyli ogółem 936 g płynu rozcieńczającego. Całkowita ilość surowicy pełnej wynosiłaby zatem 7,000 — 936 = 6,064 g.

Jak z powyższego wynika w przeprowadzonym doświadczeniu wydajność surowicy przy metodzie odwłókniania była o 2,26% większa niż przy metodzie krzepnienia. Co do metody plazmatycznej to wydajność jej była o 0,9% mniejsza od metody krzepnienia, ale wyniku tego nie można uznać za miarodajny, gdyż przy małej ilości przerobionej krwi duży procent stanowiłyby straty przy wygniataniu surowicy przez worek flanelowy.

TABELA I

Grupa zwierząt	Metoda	Waga w kg			Wydajność w %	Mianowanie po 2,5 roku					Wygląd surowicy
		krwi	surowicy konserwowanej	surowicy pełnej		surowica	kultura	szczepione gołębie	padłe gołębie	ocena	
Konie A 4 szt.	krzepnienia	10	6,780	6,105	61,05	0,1	0,5	6	2	2,5 n	normalny
						0,2	0,5	2	–		dobry
						0,5	0,5	2	–		
	odwłókniania	11	7,740	6,965	63,31	0,1	0,5	6	1	2,5 n	czerwony
						0,2	0,5	2	–		obfity osad
						0,5	0,5	2	–		
Konie B 4 szt.	krzepnienia	10	6,825	6,150	61,50	0,1	0,5	6	2	2,5 n	normalny
						0,2	0,5	2	–		dobry
						0,5	0,5	2	–		
	plazmatyczna	10	7,000	ca 6,064	ca 60,6	0,1	0,5	6	5	2 n	jasnosłomkowy
						0,2	0,5	2	–		zmniejszona
						0,5	0,5	2	–		lepkość
						Kontrola 0,5		2	2		

Mianowanie wszystkich surowic wykonane w 2,5 roku po upuście nie wykazało różnic w mianie między surowicą otrzymaną metodą krzepnienia i odwłókniania. Natomiast surowica otrzymana metodą plazmatyczną okazała nieco niższe miano. Musimy jednak wziąć pod uwagę, że zawierała ona tylko 86,5% surowicy pełnej, gdy surowica otrzymana dwoma pozostałymi metodami zawierała 90% surowicy pełnej.

DOŚWIADCZENIE II

Doświadczenie to przeprowadzono celem sprawdzenia wydajności metody plazmatycznej z wyeliminowaniem wygniatania surowicy przez flanelę. Wyniki podaje tabela II.

TABELA II

Grupa zwierząt	Metoda	Waga w kg			Wydajność w %
		krwi	surowicy konserwowanej	surowicy pełnej	
10 koni uodpornionych włoskowcem różycy	krzepnienia	15,165	11,0	9,925	65,44
	plazmatyczna	16,1	12,7	ca 10,715	66,5

Badanie wykonano na 10 koniach uodpornianych włoskowcem różycy, od których pobrano po 1 cylindrze krwi do przerobu metodą krzepnienia i po 1 cylindrze do przerobu metodą plazmatyczną. Krzepnienie odbyło się w temperaturze 20^0; I zlew na trzeci dzień po upuście dał 9,100 g; II zlew na czwarty dzień — 525 g i III zlew na szósty dzień — 300 g surowicy, co wskazuje na duże znaczenie II i III zlewu.

Przy metodzie plazmatycznej krew zmieszano z 750 g 10% cytrynianu sodu i otrzymano po odwirowaniu 11,950 g plazmy; do plazmy dodano 240 g 10% chlorku wapnia oraz 1,220 g 5% fenolu i po wymieszaniu rozlano do cylindrów szklanych upustowych. Gdy plazma skrzepła została zciężarkowana, otrzymano 12,700 g surowicy.

Licząc, że przy wirowaniu przeszło do plazmy tylko 70% cytrynianu (tj. tyle ile wyniosła wydajność plazmy przy wirowaniu krwi z cytrynianem) plazma zawierała 525 g płynu rozcieńczającego z cytrynianu i 1,460 g z chlorku wapnia i fenolu, czyli razem 1,985 g.

Jak z powyższego wynika, surowica otrzymana metodą plazmatyczną zawierała 12,700 — 1,985 = 10,175 g surowicy pełnej czyli wydajność metody wynosiła 66,5%, tj. o 1% więcej niż przy metodzie krzepnienia.

DOŚWIADCZENIE III

Celem doświadczenia było powtórzenie badania nad wydajnością surowicy przy metodzie odwłókniania z użyciem jednak zamiast defibrynatora typu kierżanki, defibrynatora Hauptnera.

Wyniki podaje tabela II. Również i w tym doświadczeniu metoda odwłókniania dała o 4,4% większą wydajność od metody krzepnienia.

DOŚWIADCZENIE IV i V

Doświadczenia te miały na celu porównanie wyników odwłókniania prętem drewnianym stosowanym zwykle przez rzeźników, z wynikami osiąganymi przy użyciu defibrynatora Hauptnera. Ku naszemu zdziwieniu czterokrotnie powtarzane próby na różnych grupach koni zgodnie wykazały, że przy odwłóknianiu ręcznym zwykłym prętem drewnianym, ilość skrzepów jest mniejsza, a wydajność surowicy większa niż przy użyciu defibrynatora Hauptnera. Różnica wydajności wynosiła od 4,4 do 9,2% — co wskazuje na wielką oszczędność, jaką można osiągnąć stosując tę metodę. Wyniki doświadczeń podaje tabela III.

TABELA III

Nr doświadczenia	Grupa zwierząt	Metoda przerobu	Sposób odwłókniania	Ilość krwi kg	Ilość skrzepów		Ilość surowicy pełnej		Różnica wydajności w stosunku do defibr. Hauptnera
					kg	%	kg	wydajność	
III	Konie uodpornione włoskowcem różycy D	krzepnięcia	—	16,45	—	—	9,8	59,5	—4,4%
		odwłóknienia	defibrynator Hauptnera	16,90	2,0	11,8	10,8	63,9	
IV	Konie uodpornione włoskowcem różycy E	odwłóknienia	defibrynator Hauptnera	17,40	2,6	14,9	10,6	60,9	
		"	ręcznie pręt drewn.	12,90	1,4	10,8	8,3	64,3	+4,4%
V	Konie uodpornione włoskowcem różycy 22/6	"	defibrynator Hauptnera	35,50	3,0	8,45	18,7	52,6	
		"	ręcznie pręt drewn.	27,50	2,0	7,27	16,2	58,9	—6,3%
	Konie uodpornione włoskowcem różycy 27/7	"	defibrynator Hauptnera	36,00	4,5	12,5	18,9	52,5	
		"	ręcznie pręt drewn.	25,00	1,6	6,4	13,3	57,2	+4,7%
	Konie uodpornione włoskowcem różycy 3/8	"	defibrynator Hauptnera	34,50	3,2	9,0	18,0	52,1	
		"	ręcznie pręt drewn.	22,00	1,0	4,5	13,5	61,3	+9,2%

DOŚWIADCZENIE VI

Następnym celem jaki sobie postawiłem było skonstruowanie defibrynatora, któryby się nadawał do zmechanizowania przy zachowaniu wydajności pręta drewnianego.

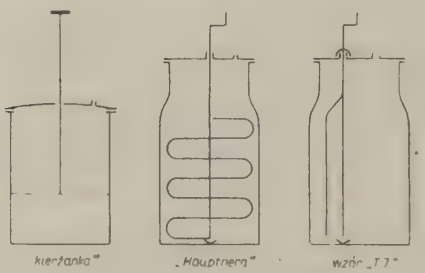
Jednak przed przystąpieniem do pracy nad defibrynatorem trzeba było rozwiązać pytanie — czy niski procent skrzepów przy użyciu pręta nie zależy od grubości kija. Wypróbowano zatem dwa pręty: jeden o szerokości skrzydełek defibrynatora Hauptnera, to jest 7 — 8 cm i drugi o grubości 2,5 — 3 cm. Jak wynika z załączonej tabelki grubość pręta nie ma wpływu na procent skrzepów włóknika.

TABELA IV

Grupa koni	Metoda odwłóknniania	Ilość krwi kg	Ilość skrzepów	
			kg	%
Konie uodpornione włosk. różycy G — 10	pręt o średnicy 7 cm	20,2	1,6	7,91
	pręt o średnicy 2,5 cm	28,3	2,2	7,77
Konie uodpornione włosk. różycy G — 11	pręt o średnicy 8 cm	24,9	1,5	6,02
	pręt o średnicy 3 cm	25,3	1,5	5,96

DOŚWIADCZENIE VII i VIII

Obserwując odwłóknianie ręczne prętem drewnianym doszedłem do wniosku, że przyczyną dobrego odwłókniania jest nieregularne działanie ręki, wskutek czego nie może się wytworzyć w środku bańki, jak to się dzieje w defibrynatorze Hauptnera, „martwe pole" powoli wirujące wraz ze skrzydełkami defibrynatora i przez to źle odwłókniane.



Rys. 1

Początkowo chciałem to rozwiązać drogą wprowadzenia tak zwanego „targańca", ale potem skonstruowałem pręt wirujący w bańce mimośrodkowo. Przy tego rodzaju ustawieniu martwe pole nie może się wytworzyć, gdyż zostaje spychane na środek bańki, gdzie rozbija je wirujący pręt.

Prototyp nowego odwłókniacza wykonany według mych wskazówek przez ślusarza

DZPB ob. J. Krysińskiego został zakwalifikowany przez Urząd Patentowy jako udoskonalenie techniczne pod Nr 2813 z dnia 22.V.1953 r. Zasadnicze cechy odwłókniacza podaje załączony szkic (Rys. 1).

Wyniki wypróbowania defibrynatora wzór „T. J." podaje tabela V.

Wykonane doświadczenia wykazały, że wydajność surowicy przy użyciu defibrynatora „wzór T. J." jest stale najwyższa i wynosiła u koni

TABELA V

Nr doświadczenia	Grupa zwierząt	Sposób odwłóknienia	Ilość krwi kg	Ilość surowicy pełnej kg	Wydajność surowicy %	Różnica w stosunku do defibrynatora wzór „T. J."
VII	Konie uodpornione włosk. różycy G. 12 I up.	pręt ręcznie	23,0	14,4	62,60	— 2,31
		defibrynator Hauptnera	21,6	12,9	59,07	— 6,02
		defibrynator wzór „T. J."	22,0	14,5	65,09	—
	Konie uodpornione włosk. różycy G. 13 II up.	pręt ręcznie	24,2	15,8	65,70	— 1,24
		defibrynator Hauptnera	23,3	15,0	64,37	— 2,57
		defibrynator wzór „T. J."	24,2	16,2	66,94	—
	Buhaje ozdrow. po pryszczycy	defibrynator Hauptnera	22,2	12,1	59,90	— 2,6
		defibrynator wzór „T. J."	19,5	12,2	62,50	—
VIII	Konie uodpornione włosk. różycy G. 15	pręt ręcznie	25,8	16,3	63,17	— 7,97
		defibrynator wzór „T. J."	25,3	18,0	71,14	—
	Konie uodpornione włosk. różycy G. 21	pręt ręcznie	26,8	16,8	60,82	— 4,16
		defibrynator wzór „T. J."	26,9	17,5	64,98	—
	Buhaje uodpornione *E. coli*	pręt ręcznie	15,8	10,3	65,17	— 2,83
		defibrynator wzór „T. J."	15,0	10,2	68,00	—

średnio 4,3% więcej niż przy defibrynatorze Hauptnera, średnio 3,9% więcej niż przy odwłóknianiu prętem drewnianym.

U buhai: 2,6% więcej niż przy defibrynatorze Hauptnera — 2,83% więcej niż przy odwłóknianiu prętem drewnianym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wydajność surowicy, to jest procent surowicy pełnej, otrzymanej z krwi zależy, poza jakością samej krwi, w znacznej mierze od technologii przerobu.

Autor dążąc do obniżenia kosztów własnych produkcji surowic wypróbował w warunkach produkcyjnych na koniach i buhajach różne metody przeróbki krwi.

Badania wykazały między innymi co następuje:

1. Metoda odwłóknianiа przy użyciu defibrynatora łopatkowego typu Hauptnera dała u koni wydajność surowicy większą o 4,4% niż metoda krzepnienia.

2. Miano surowicy przeciwróżycowej, otrzymanej metodą odwłóknianiа, w 2,5 roku po upuście krwi nie wykazało żadnej różnicy w stosunku do miana surowicy otrzymanej z tegoż upustu metodą krzepnienia.

3. Metoda odwłóknianiа z użyciem defibrynatora własnego pomysłu autora (wzór „T. J." — Urząd Patentowy Nr 2813) dała najlepsze wyniki, podnosząc wydajność surowicy w porównaniu do defibrynatora typu Hauptnera u koni o 2,57 — 6,02 przeciętnie 4,3%, u buhai o 2,6%. Odwłókniacz wzór „T. J." nadaje się do mechanizacji, jest łatwy do sporządzenia, mycia i sterylizacji i pozwala na jałową pracę.

4. Metoda plazmatyczna z wprowadzeniem do plazmy chlorku wapnia i wygniataniem następnie surowicy w cylindrach szklanych za pomocą ciężarków dała wydajność (w przeliczeniu na pełną surowicę) o 1% większą od metody krzepnienia. Otrzymana surowica 2,5 roku po upuście miała miano nieco niższe od surowicy z tegoż upustu otrzymanej metodą krzepnienia. Metoda wymaga dalszego rozpracowania, gdyż mogłaby mieć duże znaczenie przy produkcji surowicy przeciwróżycowej metodą wielokrotnych upustów z reinfuzją krwinek.

T. Ясмжембски

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД УВЕЛИЧЕНИЕМ КОЛИЧЕСТВА СЫВОРОТКИ ПОЛУЧАЕМОЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ КРОВИ

Резюме

Автор в производственных условиях биофабрики испытал разные методы переработки крови.

Произведенные исследования показывают, что наибольшее количество сыворотки было получено путем дефибринирования крови с последующим сепарированием на центрифуге — с применением дефибринатора сконструированного автором.

Количество полученной сыворотки при этой методике было выше чем при применении других методов в среднем о 4,3% у лошадей и о 2,6% у быков.

T. Jastrzębski

THE STUDIES ON SOME METHODS OF SEPARATING THE BLOOD SERUM DURING THE PRODUCTION OF THERAPEUTIC ANTISERA

Summary

The relative productiveness of various methods of preparing therapeutic antisera was studied. It was shown that the best results were obtained when the fibrine was separated in special fibrine-separator („defibrynator T. J.") constructed by the author (fig. 1).

SPIS TREŚCI

H. Kwarta: Wpływ różnych metod wysuszania na aktywność faga . 3
E. Kocwowa: Działanie penicyliny i aureomycyny na *Saccharomyces cerevisiae, Thermobacterium cereale* i *Acetobacter rancens* . . . 11
A. Horubała: Kwas cytrynowy jako czynnik modyfikujący przebieg fermentacji kapusty 27
A. Jankun: Badania nad szczepem drożdży „Porzeczka 1" wyizolowanym z mikroflory występującej na porzeczce czerwonej 45
J. Iskierko, M. Sabbo i R. Franaszczyk: Podłoże z hydrolizatem fasoli dla wzrostu *H. pertussis* 61
T. Jastrzębski: Badania nad wydajnością surowicy przy różnych metodach przerobu krwi 67

СОДЕРЖАНИЕ

Г. Кварта: Влияние разных методов высушивания на активность бактериофагов 3
Е. Коцвова: Влияние пенициллина и ауреомицина на *Saccharomyces cerevisiae, Thermobacterium cereale* и *Acetobacter rancens* . . 11
А. Горубала: Лимонная кислота как модифицирующий фактор брожения капусты 27
А. Янкун: Исследования над штаммом дрожжей „Смородина 1" изолированным из микрофлоры, выступающей на красной смородине 45
И. Искерко, М. Саббо и Р. Франащик: Среда с гидролизатом фасоли для культивирования *Haemophilus pertussis* . . . 61
Т. Ястжембски: Исследования над увеличением количества сыворотки получаемой при применении разных методов переработки крови 67

CONTENTS

H. Kwarta: The influence of various methods of drying and storing on *coli*-phages 3
E. Kocwowa: The influence of penicillin and aureomycin on the *Saccharomyces cerevisiae, Th. cereale* and *Acetobacter rancens* . . 11
A. Horubała: Citric acid as a factor modyfying the sauerkraut fermentation 27
A. Jankun: Investigation in the yeast Currant 1 isolatet from the microflora occurring on red currant 45
J. Iskierko, M. Sabbo and R. Franaszczyk: The bean hydrolyzate — medium for cultivation of *Haemophilus pertussis* . . . 61
T. Jastrzębski: The studies on some methods of separating the blood serum during the production of therapeutic antisera 67

Cena zł 10.—